HAL
open science

La réponse immunitaire mucosale intestinale lors de l'infection par les Escherichia coli entérohémorragiques : Rôle et régulation de la synthèse de monoxyde d'azote

Marjolaine Vareille

To cite this version:

Marjolaine Vareille. La réponse immunitaire mucosale intestinale lors de l'infection par les Escherichia coli entérohémorragiques : Rôle et régulation de la synthèse de monoxyde d'azote. Microbiologie et Parasitologie. 2008. Français. NNT : . tel-02813246

HAL Id: tel-02813246

https://hal.inrae.fr/tel-02813246

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.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL **UNIVERSITE D'AUVERGNE**

Année 2008

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

N° d'ordre :

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
pour l'obtention du grade de DOCTEUR
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Microbiologie/Immunologie

soutenue le 05 Décembre 2008

par

VAREILLE Marjolaine

La réponse immunitaire mucosale intestinale lors de l'infection par les *Escherichia coli* entérohémorragiques : Rôle et régulation de la synthèse de monoxyde d'azote

Président : Mr Michel DAPOIGNY, Professeur, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand.

Membres : Mr Jean FIORAMONTI, Directeur de Recherches, INRA, Toulouse.
Mr Alain P. GOBERT, Chargé de Recherches 1, HDR, INRA, Theix.

Rapporteurs : Mr Philippe SANSONETTI, Professeur, Institut Pasteur, Paris
Mr Michel LEPOIVRE, Directeur de Recherches, CNRS, Université de Paris XI, Orsay.

Unité de Microbiologie, UR454, INRA, Centre de recherche de Clermont-Ferrand/Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France.

Remerciements

Quel beau voyage ! 3 ans déjà que je vogue dans les lagons mystérieux du NO et des Escherichia coli entérohémorragiques. Je suis rentrée matelot j'en redescendrai capitaine. Cette aventure restera inoubliable…

Novembre 2005, j'embarque à bord de l'Unité de Microbiologie à l'INRA de Clermont-Ferrand/Theix. Je remercie toutes les personnes qui ont fait de ce voyage… bien plus qu'un voyage scientifique.

Je remercie tout d'abord Madame Evelyne FORANO, Directrice de l'unité de Microbiologie, qui m'a accueillie dans son laboratoire.

Un grand MERCI à Monsieur Alain P. (et attention, il y tient à son P. !) GOBERT, mon commandant de bord, qui a su me faire partager sa passion pour la science (le NO c'est la vie !). Merci Alain pour tes conseils judicieux, ta disponibilité, ton dynamisme et la confiance que tu as su m'accorder. En prenant du recul (n'est-ce pas chef, prendre du recul !), ces trois années passées à tes côtés m'auront apporté énormément tant sur le plan scientifique que personnel. Je saurai m'en souvenir… « *de part la transparence que j'ai pour toi !* »

J'exprime ma profonde reconnaissance à Madame Christine MARTIN, Directrice de l'équipe 'Patho'. Merci Christine d'avoir toujours gardé un œil sur moi pendant ces trois ans. Merci pour tes nombreux conseils et ta disponibilité.

Merci Alain et Christine pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans d'aussi bonnes conditions et de m'avoir ouvert de nouveaux horizons (Australie, Canada, Ecosse).

Je tiens à remercier Monsieur Philippe SANSONNETTI et Monsieur Michel LEPOIVRE qui me font l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse, Monsieur Jean FIORAMONTI qui a accepté de juger mon travail ainsi que Monsieur Michel DAPOIGNY pour avoir accepter de présider ce jury. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude.

Je remercie toutes les personnes qui ont collaboré à ce travail : Tout d'abord, merci à Monsieur François RANNOU et Natacha THELIER du laboratoire de Pharmacologie, Toxicologie et Signalisation Moléculaire de l'Université Paris Descartes à Paris, pour le travail sur HO-1. Madame Josée HAREL et Sébastien du laboratoire de biologie moléculaire au GREMIP à Saint-Hyacinthe au Canada pour la réalisation des puces à ADN ainsi que tous les membres du GREMIP pour leur accueil chaleureux. Merci à Rupesh Chaturvedi du Département de gastroentérologie de l'Université de Vanderbilt à Nashville, USA pour ses analyses en cytométrie de flux. Merci à Monsieur Amed OUALI et Gérald COULIS de l'Unité QUAPA pour m'avoir formé à la technique de gel filtration. Merci à Monsieur Christophe CHAMBON et Jérémy PINGUET de la plateforme protéomique pour le travail sur l'identification du facteur bactérien. Merci à Madame Brigitte GAILLARD-MARTINIE pour sa précieuse aide en microscopie et histologie.

J'adresse un merci tout particulier à tous mes compagnons de bord de l'équipe 'Patho'. Merci à Alexandra et Annie pour vos précieux conseils techniques et votre aide tout au long de cette thèse. Alex, merci pour ta bonne humeur, je ne suis pas sur que je retrouve une technicienne avec autant d'anecdotes que toi ! Merci pour tous les bons moments et les fous rires que j'ai passé avec toi ! Annie, merci pour ta gentillesse et ton aide pour cette fin de thèse. *Merci à vous deux !* Je tiens également à remercier Yolande pour ses encouragements et son soutien tout au long de ma thèse. Enfin, je remercie les 'anciens de la patho' : mon tibô, merci de m'avoir initié à la qPCR, merci pour ta bonne humeur et d'être encore là pour moi même en étant de l'autre côté de l'Atlantique, *Good luck the tennessean !* Thomas et Fahima, merci pour vos précieux conseils et votre soutien et enfin, merci à notre jeune retraité Jean-Pierre pour ses nombreux conseils.

Je remercie également les membres du groupe « Eco dig ». Merci à Monsieur le futur DU, Christophe DEL'HOMME, dit « minou », pour sa bonne humeur et son aide pour le modèle rat. Merci à Eve pour l'obtention des souches commensales (mais aussi à Alain, pour avoir donné un peu de sa personne !!) et enfin merci à Madame Annick BERNALIER-DONADILLE pour sa gentillesse et *parce qu'elle le vaut bien !*

Merci aux « filles de la microbio », Coco, Caro, Grande bibiche. Qui ne connait pas ce fameux quatuor que l'on a formé pendant ces trois ans à l'INRA ? Merci les filles pour votre gentillesse et la bonne humeur que vous avez mise au labo pendant ces années. Vous m'avez vu rire, pleurer, râler et râler… mais vous avez toujours été là pour moi. Merci Coco et Grande bibiche, les danseuses de zouk, pour les escapades au Del sol, merci à toi Caro, pour ta gentillesse et ton écoute : entre thésardes, on se comprend ! Bon courage pour ta dernière année !

Les filles, je n'oublierai jamais tout ce que vous avez fait pour moi…

Je remercie également tous les membres du laboratoire de Pathogénie Bactérienne de l'Université d'Auvergne pour leur soutien pendant ces trois années. Je remercie Madame Arlette DARFEUILLE-MICHAUD pour sa gentillesse et les précieux conseils qu'elle a su m'apporter. Un merci tout particulier à Nicolas BARNICH pour son soutien et son aide pendant cette thèse. Je voudrai également remercier Madame Anne-lise GLASSER pour les moments passés ensemble en microscopie confocale.

Merci Arlette, Anne-lise et Nico mais également Jean-Pierre Muguet pour m'avoir permis d'enseigner, ça restera des moments inoubliables…

Enfin, merci à Adeline, Pedro, Fred, Sylvie, Pierre pour leur bonne humeur !

Je tiens à remercier mes « petites stagiaires » qui ont rythmé mes trois années de thèse. Merci à Audrey, Coralie et Coraline pour votre aide précieuse et votre gentillesse. *Bonne continuation à vous trois !*

Enfin, merci à Alexandre « ma secrétaire préférée ! », je crois que tu es la seule personne que je peux résumer en une lettre, devine laquelle ? C'est la 17ème lettre ! merci pour tes mails matinaux peu…scientifiques et pour ta bonne humeur! Merci à lolo pour tes venues quasi quotidiennes dans mon bureau ! Merci à « pt bibi » pour tout ce qu'il sait…merci de ton soutien…Merci à Gégé alias « Professeur Andant » pour toutes les bêtises que tu m'as raconté pendant ces trois ans. Merci à Mr. Chassard pour ses précieux conseils pour la Suisse et merci à Fred, Arnaud, Fohet, Steph, Brigitte et tous ceux que j'oublie de citer…

Merci à ma bandeoufs : Vaness, Ju, Poney, John, Clo, Kikinette, Dédé, Vieux sac, Céline, Aline et Guillaume pour votre soutien et pour m'avoir permis de me changer les idées lors de nos nombreux w.e festifs !

Je ne peux terminer ces remerciements sans remercier mes parents, ma mémé et Vincent pour leur soutien sans faille. Merci maman et papa pour avoir écouté (toutes!) mes présentations orales, pour être venu me voir au Canada et pour votre soutien. Merci mémé pour tes précieuses relectures. Enfin, le plus fort de mes remerciements est pour Vincent. Merci d'avoir été présent jusqu'aux dernières lignes de ce mémoire. En plus de me supporter dans des conditions « normales », ce qui n'est déjà pas une mince affaire je le conçois, tu as du subir mon humeur de *thésarde en fin de thèse* et de se mettre en retrait. Et pourtant, quelle présence indispensable. Merci d'être là pour moi…

« Après ce bain de soleil…la vague regonflée embrasse l'horizon…se jette à l'eau et mets les voiles… »

[Eric Dauzon]

Merci à tous, parce que vous le valez bien !

A mes parents,

A Vincent,

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS 1

AVANT-PROPOS 2

REVUE DE LITTÉRATURE

I. LA RÉPONSE IMMUNITAIRE MUCOSALE INTESTINALE 3

I-1. L'IMMUNITÉ 3

I-2. ORGANES ET CELLULES DE L'IMMUNITÉ 4
- I-2-1. Les cellules somatiques
- I-2-2. La lignée myéloïde
  - I-2-2-a. Les polynucléaires
  - I-2-2-b. Les mastocytes
  - I-2-2-c. Les macrophages
  - I-2-2-d. Les cellules dendritiques
- I-2-3. La lignée lymphoïde
  - I-2-3-a. Les cellules T auxiliaires αβ
  - I-2-3-b. Les cellules T cytotoxiques
  - I-2-3-c. Les cellules NK
  - I-2-3-d. Les LB
- I-2-4. Le système immunitaire intestinal

I-3. MOLÉCULES EFFECTRICES DE LA RÉPONSE IMMUNE 12
- I-3-1. Les chimiokines
- I-3-2. Les cytokines
- I-3-3. Les Ig
- I-3-4. Le complément

I-4. LA RÉPONSE IMMUNE INNÉE INTESTINALE 15
- I-4-1. Le microbiote intestinal
- I-4-2. Le mucus
- I-4-3. La phagocytose
- I-4-4. Activation et réponse des cellules
  - I-4-4-a. Les récepteurs cellulaires
  - I-4-4-b. La transduction du signal
  - I-4-4-c. Les effecteurs de la réponse innée

I-5. LA RÉPONSE IMMUNE SPÉCIFIQUE INTESTINALE 21
- I-5-1. La balance Th1/Th2
- I-5-2. La réponse Th17
- I-5-3. Les lymphocytes Treg
- I-5-4. La réponse humorale intestinale

II. LE MONOXYDE D'AZOTE 25

II-1. PROPRIÉTÉS CHIMIQUES DE NO 25
II-1-1. Réactions avec l'oxygène et ses dérivés
II-1-2. Réactions avec les métaux de transition
II-1-3. Réactions avec les noyaux aromatiques
II-1-4. Réactions avec les thiols
II-1-5. Réactions avec les centres fer-soufre

II-2. SYNTHÈSE ENZYMATIQUE DE NO 29
II-2-1. Les différentes isoformes des NOS
II-2-2. Régulation de l'expression de la iNOS
II-2-2-a. Mécanismes d'induction de la iNOS
II-2-2-b. Les voies de signalisation
II-2-2-c. Stabilité des ARNm de la iNOS
II-2-2-d. Régulation post-traductionnelle
II-2-2-e. Modulation de la production de NO par la L-arginine

II-3. LES PRINCIPALES FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DE NO 33
II-3-1. Les fonctions métaboliques régulées par NO
II-3-1-a. Le NO et le système cardiovasculaire
II-3-1-b. Rôle de NO dans le système nerveux central
II-3-1-c. NO et métabolisme gastro-intestinal
II-3-2. NO, notre meilleur ennemi

II-4. RÉPONSE DES *E. coli* AU NO 36
II-4-1. Les senseurs de NO
II-4-1-a. NorR
II-4-1-b. NsrR
II-4-1-c. Autres senseurs de NO
II-4-2. Les systèmes de détoxification du NO

III. LES *E. coli* PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINE 40

III-1. LES *E. coli* PATHOGÈNES INTESTINAUX 40

III-2. CLASSIFICATION DES STEC 41
III-2-1. Classification antigénique des STEC
III-2-2. Les séropathotypes des STEC
III-2-2. Classement phylogénétique

III-3. ÉPIDÉMIOLOGIE DES INFECTIONS À EHEC 42
III-3-1. Réservoirs et vecteurs
III-3-2. Sources d'infection
III-3-3. Epidémiologie des infections humaines
III-3-3-a. Les épidémies
III-3-3-b. Les cas sporadiques

III-4. CLINIQUE DES INFECTIONS PAR LES EHEC 45
III-4-1. Les symptômes intestinaux

III-4-2. Le SHU
III-4-3. Le PTT
III-4-4. Mécanismes histopathologiques du SHU/PTT
III-4-5. Traitements
III-4-5-a. De nouvelles pistes thérapeutiques
III-4-6. Diagnostic

III-5. LES MÉCANISMES MICROBIENS DE LA PATHOGÉNICITÉ 50
III-5-1. Résistance à l'acidité gastrique
III-5-1-a. Le système oxydatif
III-5-1-b. Le système glutamate-dépendant et arginine-dépendant
III-5-1-c. Régulation des systèmes glutamate-dépendant et arginine-dépendant
III-5-2. Attachement aux cellules épithéliales et perturbations du cytosquelette
III-5-2-a. L'attachement intime
III-5-2-b. Mode d'injection d'effecteurs bactériens dans la cellule hôte
III-5-2-c. Les effecteurs bactériens injectés
III-5-2-d. Régulation de l'expression des gènes du LEE
III-5-2-e. Un modèle d'interaction des EHEC aux cellules épithéliales
III-5-3. Les symptômes hémorragiques
III-5-3-a. Régulation de l'expression des gènes *stx*
III-5-3-b. Structure des Stx
III-5-3-c. Stx1 *versus* Stx2
III-5-3-d. Effets des Stx sur l'épithélium intestinal
III-5-3.-e. Action sur l'endothélium
III-5-4. Les autres facteurs de virulence

III-6. MODULATION DES RÉPONSES IMMUNES PAR LES EHEC..... 69
III-6-1. Etudes chez les patients infectés
III-6-2. Modulation de la réponse innée des cellules épithéliales par les EHEC/EPEC
III-6-2-a. Activation de la transduction du signal
III-6-2-b. Implication des facteurs bactériens

OBJECTIFS DU TRAVAIL 73

CHAPITRE 1 :
NO EST UN INHIBITEUR DE LA PRODUCTION DE Stx PAR LES EHEC

INTRODUCTION 74

MATÉRIELS ET MÉTHODES 76

I. PRODUCTION ET DÉTECTION DE NO 76
I-1. Donneurs et chélateurs de NO
I-2. Quantification de [NOx]

II. LES EHEC..... 76

II-1. Souches et conditions de culture
II-2. Construction de mutants

III. CULTURES DE CELLULES ET INFECTIONS 78

IV. QUANTIFICATION DES ARNm 78
IV-1. Extraction des ARN totaux
IV-2. Transcription inverse des ARN
IV-3. PCR quantitative
IV-3-1. Obtention des courbes standards
IV-3-2. La PCR en temps réel
IV-4. PCR semi-quantitative

V. QUANTIFICATION DES PHAGES STX2 80

VI. DOSAGE DES STX 81

VII. WESTERN-BLOT 82

VIII. MESURE DE LA CYTOTOXICITÉ 82

IX. ANALYSES STATISTIQUES 82

RÉSULTATS 83

I. EFFET DU NO SUR LA CROISSANCE ET LA SURVIE DES EHEC 83

II. NO EST UN INHIBITEUR DE L'EXPRESSION DU GÈNE *stx2* 83
II-1. Inhibition de la production spontanée de Stx2 par NO
II-2. NO empêche la production inductible de Stx2
II-3. Effet du NO sur l'expression du gène *fliC*

III. NO DIMINUE LA SYNTHÈSE DE PHAGES BP-933W 85

IV. NO EST UN INHIBITEUR DE LA RÉPONSE SOS DES EHEC 85

V. IMPLICATION DES SENSEURS NorR ET NsrR 86
V-1. Caractérisation phénotypique des mutants
V-2. Effet des mutations sur l'expression de *stx2*
V-3. Effet des mutations sur l'expression de *recA*

VI. EFFET DU NO PRODUIT PAR DES CELLULES ACTIVÉES 88
VI-1. Expression de *stx2* dans les co-cultures EHEC/cellules Hct-8
VI-2. Mesure de la cytotoxicité des EHEC

DISCUSSION 90

PERSPECTIVES 94

CHAPITRE 2 :
NO RÉGULE L'ADHÉSION DES EHEC AUX CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES

INTRODUCTION 95

MATÉRIELS ET MÉTHODES 96

I. LES EHEC 96

II. ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES 96
- II-1. Isolation des ARN
- II-2. Synthèse des ADNc et biotinylation
- II-3. Hybridation sur puces Affymétrix et analyse

III. QUANTIFICATION DES ARNm 98
- III-1. Extraction des ARN totaux
- III-2. Transcription inverse des ARN
- III-3. PCR semi-quantitative

IV. DÉTECTION DES PROTÉINES 99
- IV-1. Extraction des protéines
- IV-2. Western-blot

V. ANALYSE DES INTERACTIONS BACTÉRIES/CELLULES ÉPITHÉLIALES 99
- V-1. Visualisation de l'adhérence bactérienne
- V-2. Mise en évidence des lésions A/E

VI. ANALYSES STATISTIQUES 100

RÉSULTATS 101

I. LE TRANSCRIPTOME DES EHEC EN RÉPONSE AU NO 101
- I-1. Induction de gènes par NO
- I-2. Répression de gènes par NO

II. NO INHIBE L'EXPRESSION DES GÈNES DU LEE 102

III. NO INDUIT LE SYSTÈME GAD 103

IV. RÉGULATION PAR GadE DE L'EXPRESSION DES GÈNES *esp* ET *ler* 103

V. EFFET DU NO SUR L'ADHÉRENCE DES EHEC AUX CELLULES ÉPITHÉLIALES 104
- V-1. NO diminue l'adhésion des EHEC aux cellules Hct-8
- V-2. Effet de la mutation *gadE* sur l'adhésion des EHEC aux cellules Hct-8

VI. NO INHIBE LA FORMATION DES LÉSIONS A/E 104

DISCUSSION 106

I. MODIFICATIONS TRANSCRIPTIONNELLES DES EHEC INDUITES PAR NO..... 106

II. RÉPRESSION DE L'EXPRESSION DU LEE PAR NO 108

PERSPECTIVES..... 112

CHAPITRE 3 :
LES EHEC INHIBENT DE LA PRODUCTION DE NO PAR LES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES

INTRODUCTION..... 113

MATÉRIELS ET MÉTHODES 114

I. LES EHEC 114
- I-1. Souches et conditions de culture
- I-2. Obtention des souches d'*E. coli* commensaux
- I-3. Construction de mutants

II. ANALYSES BIOCHIMIQUES DES FACTEURS BACTÉRIENS..... 115
- II-1. Séparation des protéines par chromatographie d'exclusion
- II-2. Détection des protéines
- II-3. Détection des sucres

III. CULTURES DE CELLULES ET INFECTIONS..... 116

IV. ANALYSES DES ARNm..... 116

V. ÉTUDES DES VOIES DE SIGNALISATION 117
- V-1. Inhibiteurs pharmacologiques
- V-2. EMSA
- V-3. Immunolocalisation des facteurs de transcription

VI. TRANSFECTION..... 118

VII. WESTERN-BLOT..... 119

VIII. ANALYSES STATISTIQUES 119

RÉSULTATS 120

I. PRODUCTION DE NO PAR LES DIFFÉRENTES LIGNÉES DE CELLULES..... 120

II. EFFET DES EHEC SUR LA PRODUCTION DE NO PAR LES CELLULES EPITHELIALES HUMAINES 120

III. LES EHEC INHIBENT L'INDUCTION DE LA iNOS DANS LES CELLULES ÉPITHÉLIALES ACTIVÉES 121

IV. PERTURBATION DE LA SIGNALISATION CELLULAIRE PAR LES EHEC 122
IV-1. Étude de la signalisation impliquée dans l'induction de la iNOS
IV-2. Modulation de NF-κB et de STAT-1 par les EHEC

V. IMPLICATION DE HO-1 DANS L'INHIBITION DE L'INDUCTION DE LA iNOS. 123
V-1. Les EHEC induisent HO-1 dans les cellules épithéliales humaines
V-2. L'inhibition de HO-1 dans les cellules activées restaure l'induction de la iNOS
V-3. Effet des principaux produits de HO-1 sur l'induction de la iNOS
V-4. HO-1 ne régule pas la iNOS dans les cellules non activées
V-5. L'HO des EHEC n'a pas d'effet sur l'induction de la iNOS

VI. VERS L'IDENTIFICATION DU FACTEUR BACTÉRIEN RESPONSABLE DE L'INHIBITION DU GÈNE DE LA iNOS 125
VI-1. Effet du contact bactéries/cellules
VI-2. Implication des principaux facteurs de virulence
VI-3. Identification du facteur bactérien par criblage d'une banque de mutants
VI-4. Identification du poids moléculaire du facteur bactérien
VI-5. Séparation chromatographique
VI-6. Le facteur bactérien n'est pas un sucre

DISCUSSION 129

PERSPECTIVES 135

CHAPITRE 4 : MODULATION DE LA RÉPONSE IMMUNE MUCOSALE DANS UN MODÈLE RAT D'INFECTION PAR LES EHEC

INTRODUCTION 136

MATÉRIELS ET MÉTHODES 138

I. EXPERIMENTATIONS ANIMALES 138

II. DÉTERMINATION DE LA COLONISATION 138

III. ANALYSE DES ARNm 138

IV. ANALYSE PROTÉIQUE 139

V. DOSAGE DE Stx2 139

VI. CYTOMÉTRIE DE FLUX 139

VII. STATISTIQUES 140

RÉSULTATS 141

I. PARAMÈTRES CLINIQUES 141

II. SUIVI DE L'IMPLANTATION DES SOUCHES BACTÉRIENNES 141

III. LA RÉPONSE IMMUNE COLIQUE 142
- III-1. Les cytokines pro-inflammatoires
- III-2. Les paramètres anti-inflammatoires
- III-3. Analyses des ratios Th1/Th2
- III-4. Infiltration de cellules immunitaires dans la muqueuse colique

IV. ANALYSE DE LA BALANCE HO-1/iNOS 143

DISCUSSION 144

PERSPECTIVES 148

DISCUSSION GÉNÉRALE

I. L'INFLAMMATION DU COLON LORS DES INFECTIONS PAR LES EHEC 150

II. LA THÉRAPIE DU SHU PAR NO 151

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 154

LISTE DES TRAVAUX 181

ABRÉVIATIONS

A/E, attachement et effacement
Ac, anticorps
AI, auto-inducteur
BCR, B cell receptor
CD, cluster de différenciation
CH, colite hémorragique
CMH, complexe majeur d'histocompatibilité
cNOS, NOS constitutive
CO, monoxyde de carbone
COX, cyclo-oxygénase
DSS, dextran sulfate de sodium
Eae, *E. coli* attaching and effacing
EDRF, endothelium derived relaxing factor
EHEC, *E. coli* entérohémorragiques
ELISA, enzyme-linked immuno-sorbent assay
EMSA, electro-mobility shift assay
EPEC, *E. coli* entéropathogènes
ERK, extracellular signal-regulated protein kinase
Esp, *E. coli* secreted proteins
FAS, fluorescent-actin staining
Foxp3, forkhead box P3
Gad, glutamate décarboxylase
Gb3, globotriosyl céramide 3
Hb, hémoglobine
HO, hème oxygénase
IFN-γ, interféron-γ
Ig, immunoglobuline
IKK, I-κB kinase
IL, interleukine
iNOS, NOS inductible
JAK, kinases de Janus
JNK, c-jun N-terminal kinase
LB, lymphocyte B
LEE, locus d'effacement des entérocytes
LPS, lipopolysaccharide
LT, lymphocyte T
MAPK, mitogen-activated protein kinase
MICI, maladies inflammatoires chroniques intestinales
MLB, milieu Luria Bertani
MOI, multiplicity of infection
NFAT, nuclear factor of activated T cells
NF-κB, nuclear factor-kappa B
NO, monoxyde d'azote
Nod, nucleotide-binding oligomerization domain
NorR, NO-responsive regulator
NOS, NO synthase
NsrR, NO_2^--responsive repressor
ODC, ornithine décarboxylase
PCR, polymerase chain reaction
Per, plasmid encoded-regulator
PI3K, phosphoinositide 3-kinase
PK, protéine kinase
PN, polynucléaires
PTT, purpura thrombotique thrombocytopénique
ROR, retinoic acid receptor-related orphan receptor
SHU, syndrome hémolytique et urémique
siRNA, small interfering RNA
SSTT, système de sécrétion de type III
STAT, signal transducers and activators of transcription
STEC, *E. coli* producteurs de Shiga-toxine
Stx, Shiga-toxine
SVF, sérum de veau fœtal
T-bet, T-box transcription factor
TCR, T cell receptor
TGF-β, tumor growth factor-β
Th, T helper
Tir, translocated intimin receptor
TLR, toll-like receptor
TNBS, acide trinitrobenzène sulfonique
TNF-α, tumor necrosis factor-α
Treg, T régulateur
vWF, facteur von Willebrand
ZnPP zinc protophorphyrin IX

AVANT-PROPOS

La réponse immunitaire permet à l'Homme de se défendre contre les agressions microbiennes. La protection de l'organisme dépend de différentes cellules et molécules effectrices dont le monoxyde d'azote (NO). NO possède de nombreuses propriétés physiologiques du fait *i*) de sa synthèse dans les milieux biologiques par l'enzyme NO synthase et *ii*) de son état radicalaire qui lui confère une réactivité importante sur les molécules des systèmes vivants. Plus particulièrement, NO produit en grande quantité lors de conditions pathophysiologiques, peut permettre de lutter contre les infections mais peut aussi participer au développement de la pathologie. Pendant ma thèse dans l'Unité de Microbiologie du centre INRA de Clermont-Ferrand/Theix, j'ai étudié l'implication du NO lors de l'infection par les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) qui sont des bactéries pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires chez l'homme.

Dans une première partie introductive, nous faisons un rappel non exhaustif des différentes thématiques qui ont été abordées pendant ma thèse. Après avoir décrit les bases de l'immunité mucosale intestinale, nous avons synthétisé les données bibliographiques sur les différentes propriétés chimiques, physiologiques et immunologiques du NO ; en particulier, nous décrivons les mécanismes par lesquels NO agit sur les bactéries. Enfin, une dernière partie est consacrée aux EHEC.

Dans les deux premiers chapitres, nous avons étudié les effets du NO sur la survie, le métabolisme et la modulation des facteurs de virulence des EHEC. Le chapitre 1 décrit l'effet du NO sur la croissance des EHEC et sur la production de Shiga-toxine, le principal facteur de virulence des EHEC. Dans le chapitre 2, nous avons analysé l'effet global du NO sur le transcriptome des EHEC. Ce travail nous a permis de mettre en évidence le rôle essentiel du NO sur l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales intestinales.

Pour compléter l'analyse des interactions NO/EHEC, nous avons recherché ensuite l'effet des bactéries sur la production de NO par les entérocytes. Ces résultats sont présentés dans le chapitre 3.

Enfin, le chapitre 4 décrit les interactions entre les EHEC et la réponse immune mucosale intestinale dans un modèle d'infection par les EHEC chez des rats axéniques.

Pour conclure, une discussion générale des résultats est présentée. Une part importante est faite aux perspectives thérapeutiques.

REVUE DE LITTÉRATURE

I. LA RÉPONSE IMMUNITAIRE MUCOSALE INTESTINALE

I-1. L'IMMUNITÉ

Le système immunitaire d'un organisme est un ensemble coordonné d'éléments qui permet de discriminer des structures moléculaires qui lui sont spécifiques et qui constituent le 'soi' et d'autres structures qui ne lui appartiennent pas que l'on qualifie de 'non soi'. Il agit d'un mécanisme de défense contre des agressions physico-chimiques (facteurs mécaniques et climatiques, agression par des agents chimiques) ou contre des infections par des pathogènes de la famille des prions, des virus, des bactéries, des champignons et des parasites. La réponse du système immunitaire implique trois processus : la reconnaissance de la particule étrangère, sa destruction et la régulation de la réponse.

Chez les Vertébrés supérieurs, chaque cellule du système immunitaire possède une fonction propre et coopère avec les autres cellules. L'ensemble de ces cellules agissent en cascade, en synergie ou sont antagonistes, et forment ainsi un réseau coordonné et homéostatique qui permet de lutter efficacement contre les pathologies. En revanche, la dérégulation anarchique de ce réseau peut conduire à l'apparition de troubles pathophysiologiques tels que les maladies auto-immunes ou les inflammations chroniques.

Les différents réseaux cellulaires qui composent la réponse immune peuvent être séparés en deux groupes distinguant les mécanismes de défense non-spécifiques et spécifiques. L'immunité non-spécifique, également appelée innée ou naturelle, met en jeu des barrières physiques (peau, muqueuse), biochimiques (enzymes, mucus, complément) et cellulaires. Les cellules de cette réponse sont les cellules phagocytaires (macrophages, cellules dendritiques) et somatiques (cellules épithéliales). Ce type de réponse est constitutif et n'augmente pas d'intensité suite à une réinfection. En revanche, l'immunité spécifique ou acquise augmente significativement d'intensité lors d'une réexposition à un micro-organisme ; les principaux effecteurs et médiateurs de cette immunité sont les lymphocytes T (LT) et B (LB). On distingue la réponse immune humorale de la réponse cellulaire. L'immunité à médiation humorale est la réaction qui se produit lorsque des LB possédant des récepteurs spécifiques sont stimulés par un antigène étranger et se différencient en clone de plasmocytes qui commencent à sécréter des anticorps. Ceux-ci sont efficaces contre les agents pathogènes circulant dans le sang et la lymphe. De plus, l'activation sélective des LB dote l'organisme de cellules mémoires à durée de vie prolongée qui interviennent dans la réponse immunitaire

secondaire. La réaction à médiation cellulaire combat les agents pathogènes déjà introduits dans les cellules soit en détruisant directement les cellules infectées soit en activant d'autres cellules de l'organisme par l'intermédiaire de cytokines. Néanmoins, la réponse innée et l'immunité spécifique sont étroitement liées puisque *i*) la réponse spécifique ne se met en place qu'après présentation des antigènes aux LT par les cellules de la réponse innée et *ii*) les cytokines libérées localement lors de la réponse innée influencent profondément l'immunité adaptative.

I-2. ORGANES ET CELLULES DE L'IMMUNITÉ

Les cellules du système immunitaire sont formées dans les organes lymphoïdes centraux, la moelle osseuse et le thymus. Toutes les cellules de la réponse immunitaire proviennent de cellules souches hématopoïétiques totipotentes produites dans la moelle osseuse et qui suivent deux voies de différenciation aboutissant à l'établissement de la lignée myéloïde et de la lignée lymphoïde. Cependant, toutes les cellules somatiques sont susceptibles d'induire une réponse immune en présentant l'antigène aux LT.

I-2-1. Les cellules somatiques

Toutes les cellules nucléées expriment à leur surface des glycoprotéines formant le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Chez l'homme, le CMH est également appelé HLA (pour human leucocytes antigens). Le CMH I peut s'associer avec des peptides provenant de la dégradation de protéines intracellulaires et présenter ces antigènes à la surface de la cellule et n'est reconnu que par les LT cytotoxiques. Par ailleurs, certaines cellules somatiques, telles que les cellules épithéliales intestinales, peuvent produire des facteurs antimicrobiens et/ou pro- ou anti-inflammatoires qui participent de façon active à la réponse immune mucosale.

I-2-2. La lignée myéloïde

I-2-2-a. Les polynucléaires

Les polynucléaires (PN) sont synthétisés dans la moelle osseuse et passent dans le sang. Leur durée de vie est très courte (24 h) et ils ne se divisent pas. Ces cellules possèdent un noyau plurilobé (2 à 5 lobes) et un cytoplasme granuleux. Cette granulation permet de les séparer en trois catégories : Les PN neutrophiles dont la fonction principale est la phagocytose, les PN éosinophiles à la physiologie comparable à celle des neutrophiles mais principalement

impliqués dans la destruction des parasites, et les PN basophiles ou mastocytes tissulaires qui sécrètent des médiateurs de l'inflammation.

I-2-2-b. Les mastocytes

Les mastocytes sont présents dans le tissu conjonctif et au niveau des muqueuses. Leur cytoplasme est formé de granules contenant des médiateurs pro-inflammatoires dont l'histamine.

I-2-2-c. Les macrophages

Fabriquées dans la moelle osseuse en 2 jours, les cellules immatures passent dans le sang sous forme de monocytes qui peuvent adhérer à différents tissus. Ils se différencient alors en macrophages, adoptant parfois des caractéristiques morphologiques spécifiques du lieu où ils se trouvent (cellules de Küpffer dans le foie, histiocytes dans le tissu conjonctif, …). Leur durée de vie est de 1 à 3 mois. Ils ont des fonctions de phagocytose et de sécrétion de médiateurs de l'inflammation.

Les macrophages sont également des cellules présentatrices d'antigènes. Ils expriment à leur surface le CMH de classe I et le CMH de classe II. Ce dernier à la propriété de s'associer à des peptides provenant de la dégradation des protéines extracellulaires endocytées et n'est reconnu que par les LT auxiliaires.

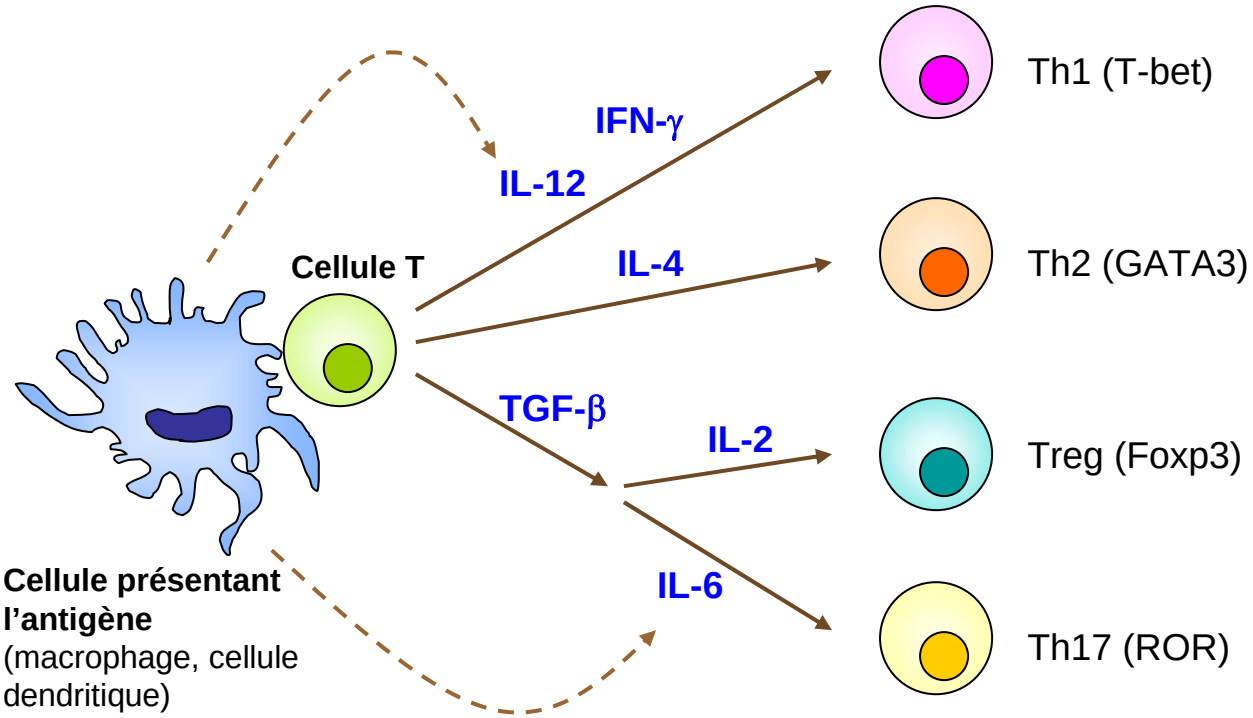
I-2-2-d. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Les cellules immatures ont la capacité de capturer l'antigène et de phagocyter les agents pathogènes. Les cellules dendritiques appartiennent à trois populations différentes : Les cellules de Langerhans (peau et épithéliums muqueux), les cellules dendritiques myéloïdes (tissus interstitiels, notamment le derme) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (organes lymphoïdes et sang).

I-2-3. La lignée lymphoïde

Les lymphocytes synthétisés dans la moelle osseuse subissent une maturation *i*) dans le thymus et deviennent des LT ou *ii*) secondaire dans la moelle osseuse pour former des LB. Ces cellules vont alors migrer dans les tissus lymphoïdes secondaires dont la rate, les ganglions lymphatiques et les plaques de Peyer au niveau intestinal. Dans le sang, ces cellules représentent 20 à 40% des leucocytes. Chaque lymphocyte porte un récepteur lui permettant

Figure 1: Mécanismes de différenciation des lignées de cellules T



Après activation antigénique par l'intermédiaire des cellules présentant l'antigène, les LT vont se différencier selon l'environnement cytokinique en lymphocytes Th1, Th2, Treg ou Th17. Les facteurs de transcription associés à ces sous-populations lymphocytaires sont présentés entre parenthèses. D'après McGeachy et Cua, 2007.

d'identifier un motif chimique appelé épitope. La plupart des cellules T possède un récepteur appelé TCR (pour T cell receptor) composé de deux glycoprotéines, les chaines α et β. Parmi les LT αβ, on distingue deux sous-populations importantes selon la présence de protéines membranaires spécifiques appelées clusters de différenciation (CD) : Les LT CD4 ou LT auxiliaires et les LT CD8 dit cytotoxiques ; les CD4 et CD8 fixent respectivement les CMH II et CMH I. D'autres cellules T minoritaires (5% du total des LT) possèdent un TCR γδ qui serait capable de réagir à la présence d'une protéine entière, sans nécessiter la présentation via les molécules du CMH.

I-2-3-a. Les cellules T auxiliaires αβ

La stimulation antigénique de cellules T $CD4^+$ naïves induit leur différenciation et multiplication. Ces LT reconnaissent les antigènes présentés par le CMH II. Selon le type d'activation, ces derniers vont se différencier en différents sous-type de cellules effectrices appelées T helper (Th) 1, Th2, Th17, T régulateurs (Treg), Th3 ou Tr1. Ces groupes sont caractérisés par des productions de cytokines et des fonctions distinctes (Fig. 1).

- **Les cellules Th1 et Th2**

En 1978, Tada et coll. ont démontré que les LT auxiliaires peuvent être réparti en deux catégories ; des cellules de type 1 qui ne se fixent pas à des colonnes de nylon et des cellules de type 2 qui se lient au nylon (Tada T et coll., 1978). Ces mêmes auteurs ont décrit que seules les cellules de type 2 facilitent la réponse des LB (Tada T et coll., 1978). Il a donc été proposé que ces lignées de cellules soient dénommées Th1 et Th2. Huit ans plus tard, il a été décrit que les LT Th1 et Th2 produisent différentes cytokines (Mosmann TR et coll., 2005). Puis de nombreuses études ont eu pour but de comprendre les différences entre les deux lignées et leurs implications respectives dans la réponse immune et dans certains troubles pathophysiologiques.

Une des caractéristiques principales des cellules Th1 est la synthèse d'interféron-γ (IFN-γ). Néanmoins, cette cytokine ne peut pas à elle seule expliquer la différenciation de cette lignée lymphocytaire. En revanche, l'interleukine (IL)-12 produite par les macrophages et les cellules dendritiques est le facteur principal pour le développement des Th1 (Trinchieri G et coll., 1995). L'IL-12 induit, dans le LT, l'expression du facteur de transcription T-bet (pour T-box transcription factor) *via* une signalisation dépendante de STAT (pour signal transducers and activators of transcription)-4 (Szabo SJ et coll., 2000). Ainsi, la transformation de cellules

T immatures ou Th2 par le gène codant pout T-bet à l'aide de rétrovirus induit la production d'IFN-γ (Szabo SJ et coll., 2000). Des souris déficientes pour le facteur T-bet développent une pathologie respiratoire due à une augmentation de LT Th2, identique à l'asthme (Finotto S et coll., 2002). C'est le facteur de transcription T-bet qui permet ensuite la synthèse des autres cytokines de type 1, l'IL-2, l'IL-12 ou le TNF-α (pour tumor necrosis factor-α). Ces cytokines ont des fonctions protectrices contre les infections microbiennes. Néanmoins, le développement de certaines pathologies inflammatoires, telle que l'arthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn, se développent et/ou sont entretenues par une augmentation des LT Th1 sur les sites des inflammations (Powrie F and Coffman RL, 1993).

Les lymphocytes Th2 produisent les cytokines IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 et ne produisent pas d'IFN-γ. L'analyse de la séquence promotrice du gène codant pour l'IL-5 chez l'homme a permis d'identifier une séquence consensus pour le facteur de transcription Gata-3 (Siegel MD et coll., 1995). Plus tard, ce facteur a été identifié comme nécessaire et suffisant au développement des LT Th2 et dont la surexpression dans des cellules Th1 permet la synthèse de cytokines de type 2 (Zheng W and Flavell RA, 1997). Par ailleurs, Gata-3 permet non seulement le développement de la lignée Th2 mais inhibe la différenciation des cellules Th1 en réprimant l'expression du gène codant pour l'IL-12 (Ouyang W et coll., 1998). Les cytokines de type 2 sont particulièrement efficaces pour permettre la lutte contre les helminthes en permettant le recrutement et la dégranulation des éosinophiles autour des tissus infectés par les parasites (Shinkai K et coll., 2002). Par ailleurs, les cellules Th2 permettent le développement de la réponse humorale. Cependant, il a été démontré que l'IL-4 et l'IL-13 sont les principaux agents responsables des réactions allergiques dont l'asthme en favorisant respectivement la production d'immunoglobulines (Ig) E par les LB et la sécrétion de mucus (Corry DB and Kheradmand F, 1999).

- **La lignée Th17**

Suite à la découverte que des lipopeptides bactériens induisent la production d'IL-17 par des LT non Th1 (Infante-Duarte C et coll., 2000), les travaux d'Aggarwal et coll. ont démontré que la stimulation de cellules spléniques par l'IL-23 pouvait conduire à une nouvelle voie d'activation des LT appelée Th17 (Aggarwal S et coll., 2003). Ces cellules ne produisent pas d'IFN-γ ni d'IL-4. Par la suite, il a été montré que des cellules T naïves murines ne se différencient pas en cellules Th17 après stimulation par l'IL-23 ; en revanche, l'activation par le TGF-β (pour tumor growth factor-β) en présence d'IL-6 a permis la production d'IL-17 par

ces cellules (Bettelli E et coll., 2006), l'IL-23 assurant la prolifération et la survie à long terme de cette lignée. Récemment, il a été démontré que la lignée Th17 exprime les isoformes α et γ du régulateur transcriptionnel ROR (pour retinoic acid receptor-related orphan receptor ; Yang XO et coll., 2008). Ce facteur est par ailleurs induit après stimulation des LT par les cytokines TGF-β + IL-6 (Yang XO et coll., 2008). Enfin, des cellules T de souris invalidées pour les gènes RORα et RORγ ne se différencient pas en LT Th17 et ne produisent plus d'IL-17 (Yang XO et coll., 2008).

L'implication de l'axe IL-23/IL-17 dans les pathologies inflammatoires a été surtout étudiée dans des modèles d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Cua DJ et coll., 2003) et d'arthrite (Murphy CA et coll., 2003). Des souris déficientes pour l'IL-23 ont montré des symptômes inflammatoires moins marqués que les souris sauvages et, de façon concomitante, une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-17, IL-6 et TNF-α. En effet, le rôle pro-inflammatoire de la lignée Th17 s'explique principalement par les effets pléiotropes de l'IL-17. Cette cytokine stimule les cellules endothéliales et épithéliales et les macrophages pour produire de nombreux médiateurs pro-inflammatoires (cytokines, chemokines, protéases, …) et favorise l'angiogenèse.

- **Les cellules Treg**

En 1995, Sakaguchi *et coll*. ont démontré l'implication des LT exprimant la chaîne alpha du récepteur de l'IL-2, également appelé CD25, dans la régulation de ces inflammations : l'injection dans des souris athymiques de LT $CD4^{+}CD25^{-}$ a induit le développement d'une gastrite ; cette dernière a été supprimée lorsque les souris ont reçu des cellules $CD25^{+}$ en même temps (Sakaguchi S et coll., 1995). De façon similaire, l'injection de cellules spléniques $CD25^{+}$ dans des souris nouveau-nées sans thymus a permis la réduction des processus inflammatoires. Ainsi, une nouvelle population de LT $CD4^{+}CD25^{+}$ suppresseur a été mise en évidence et a été appelée Treg. Plus tard, il a été établi que les cellules Treg expriment le facteur de transcription Foxp3 (pour forkhead box P3 ; Hori S et coll., 2003). Chez la souris, la mutation du gène *foxp3* aboutit au phénotype 'scurfy', caractérisé par des dérégulations immunitaires variées (Khattri R et coll., 2003) ; par ailleurs, ces souris ne possèdent pas de lymphocytes Treg (Khattri R et coll., 2003). Chez l'homme, le syndrome auto-immunitaire IPEX (pour Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome) est également associé à des mutations dans *foxp3* (Wildin RS et coll., 2001).

Le facteur de transcription Foxp3 est nécessaire non seulement à la conversion des cellules $CD4^+CD25^-$ en lymphocytes Treg (Fontenot JD et coll., 2003), mais également à leur développement (Fontenot JD et coll., 2003; Hori S et coll., 2003; Khattri R et coll., 2003). Le passage de cellules $CD4^+CD25^-$ au phénotype $CD4^+CD25^+$ via Foxp3 est induit par le TGF-β (Chen W et coll., 2003) en présence d'IL-2 (Horwitz DA et coll., 2008). En condition normale, les cellules $CD25^+$ constituent 5-10% des cellules T $CD4^+$ de la rate, du thymus et des nodules lymphoïdes (Sakaguchi S et coll., 1995). Ces lymphocytes Treg ne répondent pas à la stimulation via le TCR, ne produisent pas de cytokines IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 et IFN-γ, et inhibent la prolifération des autres cellules T (Chen W et coll., 2003). De plus, Foxp3 inhibe l'activité de deux facteurs de transcription nécessaire à l'activité des cellules T (Bettelli E et coll., 2005), NF-κB (pour nuclear factor-kappa B) et NFAT (pour nuclear factor of activated T cells). Il a par ailleurs été décrit que les cellules Treg produisent l'immunomodulateur IL-10 (Rubtsov YP et coll., 2008).

Des modèles animaux ou des investigations cliniques semblent démontrer que LT $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ sont protecteurs dans de nombreuses pathologies inflammatoires et/ou auto-immunes telle que le diabète de type 1 (Green EA et coll., 2002), l'arthrite rhumatoïde (Morgan ME et coll., 2003), la gastrite auto-immune (DiPaolo RJ et coll., 2007), l'allergie ou l'asthme (Larche M, 2007).

- **Les cellules Tr1 et Th3**

D'autres LT sont également responsables de régulations immunologiques. Les cellules Tr1 produisent de l'IL-10 et du TGF-β après une stimulation antigénique ; elles suppriment les réponses naïves ou mémoire des Th1 et des Th2 et peuvent inhiber les colites expérimentales (Groux H et coll., 1997).

Les cellules Th3 sont des clones $CD4^+$ producteurs de TGF-β, et à un moindre degré d'IL-4 et d'IL-10. Ces cellules seraient impliquées dans les mécanismes de tolérance antigénique par voie orale en favorisant la synthèse d'IgA.

I-2-3-b. Les cellules T cytotoxiques

La réponse cellulaire T CD8 se met en place pour éliminer des cellules infectées par des agents pathogènes intracellulaires, notamment les virus ; les LT $CD8^+$ ne détruisent donc pas directement les agents pathogènes. Par ailleurs, ces cellules ont un effet lytique sur les cellules tumorales. Après activation par une cellule présentatrice d'antigène et en présence de

cytokines (IFN-γ, TNF-α), les LT $CD8^+$ cytotoxiques reconnaissent et tuent des cellules infectées par trois mécanismes différents :

i) Le plus rapide (quelques minutes) et le plus efficace met en jeu des protéines secrétées par le lymphocyte T cytotoxique : il s'agit de la perforine et des granzymes. La perforine va s'insérer dans la membrane de la cellule cible et y créer des pores. La formation de ces pores n'est pas suffisante pour tuer la cible mais va plutôt permettre l'entrée des granzymes dans la cellule. Les granzymes sont des protéases qui vont cliver de nombreux substrats dans la cellule cible et conduire à la mort de celle-ci.

ii) Un second mécanisme met en jeu la protéine FasL membranaire ou secrétée par le lymphocyte T qui va se fixer sur un récepteur Fas situé sur la cible. La liaison de FasL/Fas va déclencher un programme intracellulaire conduisant à la cible conduisant à son suicide. Ce mode de lyse est plus lent (plusieurs heures) et quantitativement et souvent moins efficace que la lyse perforine/granzyme.

iii) Enfin, le TNF-α secrété par le lymphocyte T va pouvoir se fixer sur son récepteur et conduire aux mêmes types de conséquences que l'interaction FasL/Fas et à la mort par apoptose.

I-2-3-c. Les cellules NK

Les lymphocytes NK (pour natural killer) sont des lymphocytes non-T et non-B caractérisés chez l'humain par le marqueur CD56. Ils sont capables de lyser des cellules étrangères à l'organisme de manière indépendante de l'antigène et sans activation préalable. Par leur fonction de lyse, on peut les rapprocher des cellules $CD8^+$, mais la reconnaissance de la cible des NK est très différente de celle des LT. En effet, les LT reconnaissent et ne s'attaquent qu'aux cellules portant un peptide particulier présenté par le CMH, les cellules NK sont spontanément lytiques envers toutes les cellules. Cependant, de nombreux mécanismes de régulation empêchent les NK de s'attaquer aux cellules saines.

Les signaux d'activation des cellules NK sont variés, et comportent notamment des protéines produites par des cellules stressées. Par ailleurs, les cellules NK expriment le CD16 qui est un récepteur de la région Fc des Ig. Lorsque les cellules infectées ou tumorales exposent à leur surface des antigènes, les Ac viennent s'y fixer et exposent leur région Fc. Les cellules NK reconnaissent ces sites et lysent ainsi les cellules.

La lyse des cellules cibles se fait principalement par les voies perforine/granzyme et Fas.

I-2-3-d. Les LB

Les LB sont produits, maturés et différenciés dans la moelle osseuse chez l'homme. Les LB sont des médiateurs de la réponse immune humorale qui expriment à leur surface le récepteur BCR (pour B cell receptor). Ce dernier est composé de l'association d'un récepteur antigénique appelé anticorps (Ac) ou Ig avec un hétérodimère Igα/Igβ également nommé CD79A/CD79B.

L'initiation de leur activation peut s'effectuer de deux manières : *i*) fixation directe des antigènes sur les Ig de surface ou *ii*) liaison avec l'antigène présenté par les LT. Les LB activés se multiplient par expansion clonale puis se différencient en plasmocytes qui sécrètent des Ig spécifiques. Le type d'Ig produites (isotype G, A, M, D, E) est fonction de l'antigène et de l'environnement cytokinique déterminé par les LT.

L'antigène fixé par les LB peut être également internalisé et dégradé puis présenté à la surface du LB associé à des molécules du CMH de classe II. Le complexe CMH II/antigène va alors être reconnu par les LT afin de favoriser la production de cytokine de type 2 et donc favoriser la différenciation et la prolifération des plasmocytes.

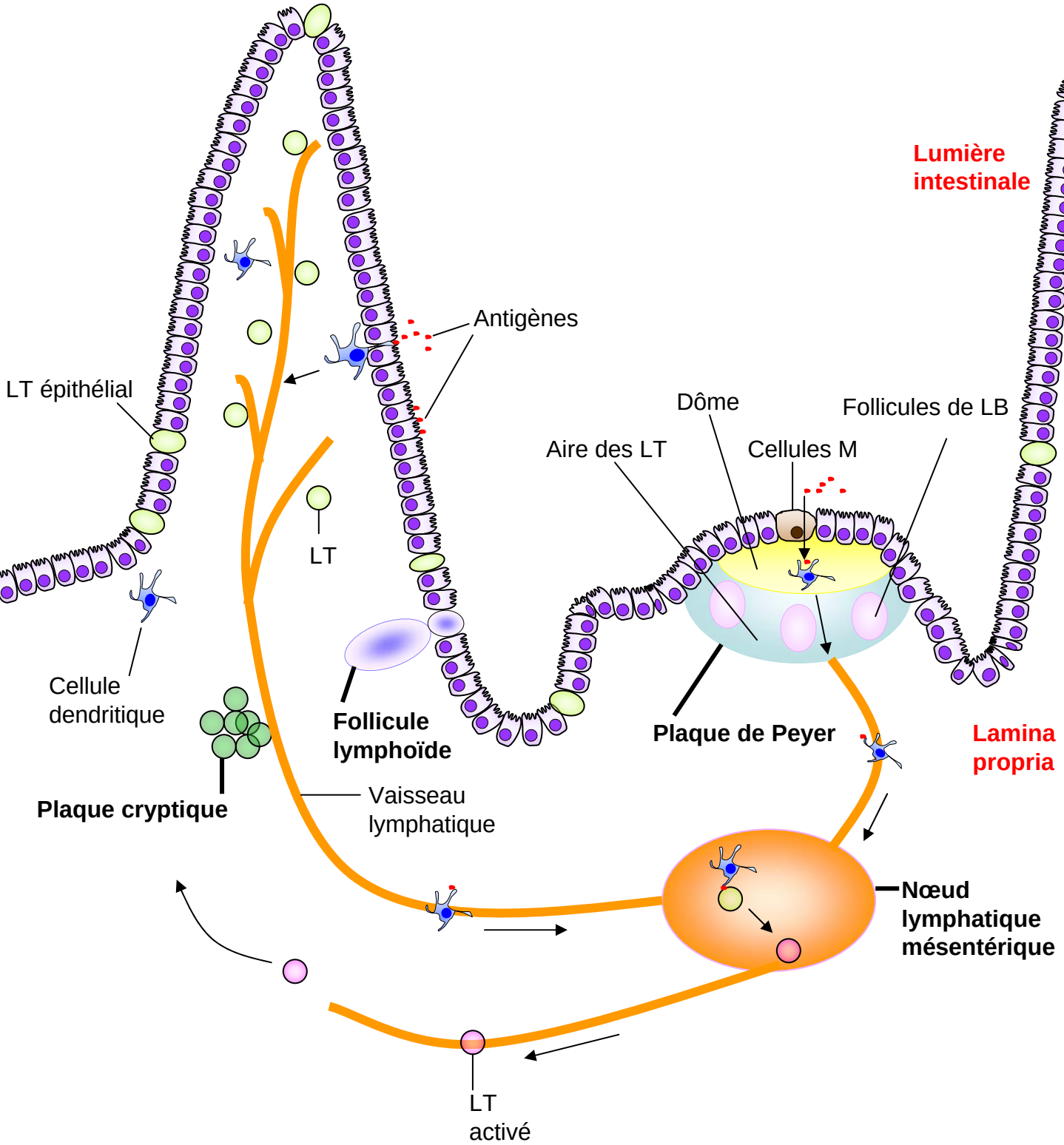
D'autre part, une partie des LB maturés se différencie en LB mémoire qui ont pour rôle de mémoriser les propriétés de l'antigène les ayant activés, afin de créer une réponse immunitaire plus rapide, plus longue, plus intense et plus spécifique en cas d'une seconde infection par ce même antigène. De plus, ces LB ont une durée de vie beaucoup plus longue que les plasmocytes. C'est sur le principe de cette mémoire immunitaire que les vaccins sont réalisés.

I-2-4. Le système immunitaire intestinal

Appelée également tissu épithélial humide, une muqueuse est une membrane qui tapisse les cavités ouvertes vers le milieu extérieur. Elles recouvrent les voies oropharingiennes, digestives, respiratoires et urogénitales. Les cellules épithéliales des muqueuses très étroitement juxtaposées constituent une barrière physique imperméable à la plupart des agents infectieux. En surface de certaines muqueuses, un film de mucus animé par les battements de cils vibratiles permet de fixer, d'enrober puis d'évacuer vers l'extérieur la plupart des particules. Enfin, les muqueuses sont protégées par différents acteurs de la réponse immunitaire innée et spécifique.

La muqueuse intestinale héberge 80% de la population des leucocytes du corps. Le maintien de l'intégrité de l'intestin et de sa fonction digestive dépend en partie de la capacité du système immunitaire mucosale à faire la distinction entre les antigènes offensifs et

Figure 2: Le système immunitaire intestinal



Les cellules dendritiques fixent les antigènes à travers la barrière épithéliale ou au niveau des plaques de Peyer. Elles présentent l'antigène aux LT au niveau des nœuds lymphatiques. D'après Spahn et Kucharzik, 2004.

inoffensifs afin de produire une réponse appropriée : une immunité active pour lutter contre les pathogènes et la tolérance du microbiote intestinal ou de substances nutritives inoffensives mais potentiellement antigéniques (Helgeland L et coll., 1996).

Le système lymphoïde intestinal est représenté sur la Fig. 2. Les plaques de Peyer sont des structures lymphatiques formées *i*) d'un épithélium intestinal particulier composé d'entérocytes et de cellules M, *ii*) d'un dôme regroupant des macrophages et de cellules dendritiques présentant les antigènes, *iii*) un ou plusieurs follicules lymphoïdes constitués de LB (centre germinatif), et *iv*) de LT formant une couronne entourant ce centre germinatif (Kerneis S et coll., 1996). Les cellules M des plaques de Peyer diffèrent essentiellement des entérocytes adjacents par l'absence d'une bordure en brosse organisée. Elles ont une fonction importante dans l'acquisition de l'immunité mucosale, par leur capacité à transporter les antigènes et les micro-organismes à travers la barrière épithéliale et à les adresser au niveau du follicule lymphoïde responsable de la mise en place d'une réponse immunitaire locale.

On distingue également des follicules lymphoïdes associés à l'épithélium intestinal et des LT $CD8^+$ et LT à TCR γδ situés entre les entérocytes. Enfin, des plaques cryptiques (petit amas de lymphocytes T), des LT auxiliaires isolés et des cellules dendritiques sont retrouvés dans la *lamina propria*.

I-3. MOLÉCULES EFFECTRICES DE LA RÉPONSE IMMUNE

I-3-1. Les chimiokines

Les chimiokines constituent une famille de peptides solubles de 6-15 kDa, composées de 70 à 80 acides aminés, possédant des propriétés chimiotactiques sur les cellules immunes. La sécrétion de ces chimiokines peut être induite lors de la réponse immune afin de favoriser l'arrivée de cellules du système immunitaire au niveau d'un site infectieux. D'autres chimiokines sont impliquées dans le contrôle de la migration de cellules au cours des processus de maintenance tissulaire ou au cours du développement. On connaît à l'heure actuelle plus de 40 chimiokines humaines différentes présentant une identité de séquence nucléotidique de 20 à 90%.

Les chimiokines sont classées en quatre familles en fonction de l'espacement entre deux de leurs cystéines en position N-terminale : La famille CXC ou alpha, dont les membres possèdent un acide aminé entre les deux premières cystéines. La famille CC ou bêta, dont les membres possèdent deux premières cystéines adjacentes. La famille CX3C ou delta, dont l'unique membre, la fractalkine, possède trois acides aminés entre les deux premières

Tableau 1: Les chimiokines

Nom systématique	Ligand humain	Récepteur	Cellules cibles
CCL1	I-309	CCR8	monocytes
CCL2	MCP-1	CCR2	monocytes
CCL3	MIP-1α	CCR1/5	neutrophiles
CCL3L1	LD78β	CCR1/5	neutrophiles
CCL4	MIP-1β	CCR5	neutrophiles
CCL5	RANTES	CCR1/3/5	lymphocytes T/monocytes
CCL6	Inconnu	CCR1/2/3	Inconnu
CCL7	MCP-3	CCR1/2/3	monocytes
CCL8	MCP-2	CCR2/3/5	monocytes
CCL9/CCL10	Inconnu	CCR1	monocytes/éosinophiles
CCL11	Eotaxine	CCR3	éosinophiles
CCL12	MCP-5	CCR2	monocytes/éosinophiles
CCL13	MCP-4	CCR1/2/3	lymphocytes T/monocytes
CCL14	HCC-1	CCR1	monocytes/éosinophiles
CCL15	HCC-2/MIP-1δ	CCR1/3	lymphocytes T/monocytes
CCL16	HCC-4/LCC-1	CCR1/2	monocytes
CCL17	TARC	CCR4	lymphocytes T
CCL18	DC-CK1/PARC	Inconnu	lymphocytes T
CCL19	MIP-3β/ELC	CCR7	lymphocytes T et B
CCL20	MIP-3α/LARC	CCR6	cellules dendritiques
CCL21	6Ckine/SLC	CCR7	lymphocytes T
CCL22	MDC	CCR4	granulocytes
CCL23	MPIF-1/CKb8	CCR1	lymphocytes T/monocytes
CCL24	MPIF-2/Eotaxine-2	CCR3	éosinophiles/basophiles
CCL25	TECK	CCR9	macrophages/cellules dendritiques
CCL26	Eotaxine-3	CCR3	éosinophiles/basophiles
CCL27	CTACK/ESkine	CCR2/3/10	lymphocytes T $CD4^+$
CCL28	MCEC	CCR3/10	lymphocytes/éosinophiles
CXCL1	GROα	CXCR2/1	neutrophiles
CXCL2	GROβ	CXCR2	neutrophiles
CXCL3	GROγ	CXCR2	neutrophiles
CXCL4	PF-4	Inconnu	neutrophiles/monocytes
CXCL5	ENA-78	CXCR2	neutrophiles
CXCL6	GCP-2	CXCR1/2	neutrophiles
CXCL7	NAP-2	CXCR2	neutrophiles
CXCL8	IL-8	CXCR1/2	neutrophiles
CXCL9	Mig	CXCR3	lymphocytes T
CXCL10	IP-10	CXCR3	lymphocytes T activés
CXCL11	I-TAC	CXCR3	lymphocytes T activés
CXCL12	SDF-1α/β	CXCR4	monocytes/cellules $CD34^+$
CXCL13	BCA-1	CXCR5	lymphocytes B
CXCL14	BRAK	inconnu	inconnu
CXCL15	Inconnu	inconnu	inconnu
CXCL16	SR-PSOX	CXCR6	lymphocytes T/cellules NK
XCL1	Lymphotactine-α	XCR1	lymphocytes
XCL2	Lymphotactine-β	XCR1	lymphocytes
CX3CL1	Fractalkine	CXCR1	lymphocytes T/monocytes/cellules dendritiques

cystéines. Les lymphotactines α et β composent la famille XC ou gamma et ne possèdent qu'une seule cystéine.

Les chimiokines exercent leur activité en interagissant avec des récepteurs de chimiokines, appartenant à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Les récepteurs de chimiokines sont dénommés d'après la classe de chimiokines à laquelle ils se lient (Tableau 1). La nomenclature communément acceptée compte donc quatre familles de récepteurs de chimiokines : CCR, CXCR, CX3CR et XCR (cette écriture constitue une exception à la nomenclature afin de différencier les récepteurs de chimiokines des récepteurs du complément dénommés CR). On compte actuellement six récepteurs de la famille CXC (CXCR1 à CXCR6), onze récepteurs pour les chimiokines CC (CCR1 à CCR11), un récepteur pour la lymphotactine (XCR1) et le récepteur de la fractalkine (CX3CR1). Chez l'homme, la plupart des récepteurs connus peuvent interagir avec plusieurs chimiokines d'un même groupe, et réciproquement une chimiokine peut se lier à plusieurs récepteurs.

I-3-2. Les cytokines

Les cytokines sont des glycoprotéines régulatrices qui induisent, contrôlent ou inhibent la réponse immunitaire. Leur taille est généralement inférieure à 30 kDa. Elles sont synthétisées par toutes les cellules somatiques, myéloïdes et lymphoïdes. Leur mode d'action est autocrine (action sur les cellules sécrétrices), paracrine (action sur les cellules proches) ou endocrine (action à distance des cellules productrices). Les cytokines agissent rarement seules, mais de manière conjointe avec d'autres cytokines, créant un réseau de communication cellulaire. Ce dernier s'établit car les cytokines ont les propriétés suivantes :

-Pléiotropie : capacité d'induire différents effets biologiques ou d'activer différentes cellules.

-Redondance : différentes cytokines ont le même effet biologique.

-Synergie : les effets combinés de deux cytokines sont supérieurs à 2 fois leurs effets séparés.

-Antagonisme : capacité à inhiber un effet biologique induit par une autre cytokine.

-Induction de cascades : une chaîne de communication cellulaire s'établit.

Le Tableau 2 dresse une liste non-exhaustive des cytokines les plus fréquemment rencontrées et étudiées. Néanmoins, la liste complète des cytokines est disponible sur http://www.copewithcytokines.de/.

Les cytokines déclenchent des voies de signalisation cellulaires en se fixant à des récepteurs des cellules cibles avec une forte affinité (de 10^{-8} à 10^{-12} M). La plupart de ces récepteurs sont associés à des kinases de Janus (JAK) qui vont assurer la transduction du

Tableau 2: Les cytokines

Cytokine/Récepteur	Cellules sécrétrices	Activités biologiques
IL-1β/CD121	•Monocytes, macrophages •Lymphocytes B et T •Cellules épithéliales et endothéliales	•Stimulation des Th1 •Prolifération des LB et synthèse d' Ig •Attraction des neutrophiles •Active les macrophages et les cellules épithéliales
IL-2/IL-2Rαβ	•Cellules Th1	•Prolifération des LT activés •Induit la différenciation des cellules Treg
IL-4/CD124	•Cellules Th2	•Prolifération et différenciation des LB •Inhibition de l'activation des macrophages
IL-5/CD125	•LT	•Croissance et différenciation des éosinophiles •Favorise le développement des LT cytotoxiques
IL-6/CD126	•Monocytes, macrophages •Cellules endothéliales, épithéliales et fibroblastes	•Médiateur pro-inflammatoire •Différenciation des LB •Différenciation de la lignée Th17
IL-9/IL-9R	•Lymphocytes T $CD4^+$	•Favorise la production d'Ig •Régule l'activation des mastocytes
IL-10/CDw210	•Lymphocytes T $CD8^+$ •Cellules Th2 •Monocytes, macrophages	•Inhibe la synthèse de cytokines et la prolifération des LT •Prolifération des mastocytes
IL-12 (p40-p35) /CD212	•Monocytes, macrophages •Cellules dendritiques	•Prolifération des LT et des cellules mononucléées •Activation des cellules NK et des Th1
IL-17/CDw217	•Lymphocytes T $CD4^+$	•Favorise l'inflammation •Médiateur de l'angiogenèse
IL-23 (p19-p40) /IL-23R	•Cellules dendritiques	•Induit la synthèse d'IFN-γ par les LT •Médiateur pro-inflammatoire
IFN-α/IFN-αβR	•Monocytes, macrophages	•Molécule anti-virale et anti-tumorale
IFN-γ/IFN-γR	•Cellules T, B et NK	•Induit l'expression de l'IL-2R dans les LT •Inhibe la prolifération des LB •Active les cellules somatiques et myéloïdes
TNF-α/CD120	•Monocytes, macrophages	•Activation des macrophages et des LT
TGF-β/bétaglycane	•Macrophages •Lymphocytes •Cellules épithéliales et endothéliales	•Inhibe la croissance des cellules somatiques et la prolifération des LT •Immunosuppressseur •Participe à la différenciation des Treg et des Th17.

signal (Fig. 3). En fixant leur ligand, les récepteurs vont former des dimères et deux sous unités de JAK vont être mises en contact. Les phosphorylations croisées des deux protéines vont permettre la création d'un site de fixation pour les facteurs de transcription STAT. Les protéines STAT vont être phosphorylées à leur tour, se dimériser et pénétrer dans le noyau pour activer la transcription de gènes. A titre d'exemple, l'IFN-γ est biologiquement actif sous forme de dimères et, est reconnu par deux récepteurs α et β, respectivement associés aux protéines JAK1 et JAK2 ; ces dernières vont recruter et phosphoryler des protéines STAT1 sur la tyrosine en position 701 (Quelle FW et coll., 1995). Les facteurs STAT1 vont alors former des dimères avant de passer dans le noyau et d'activer la transcription de gènes inductibles.

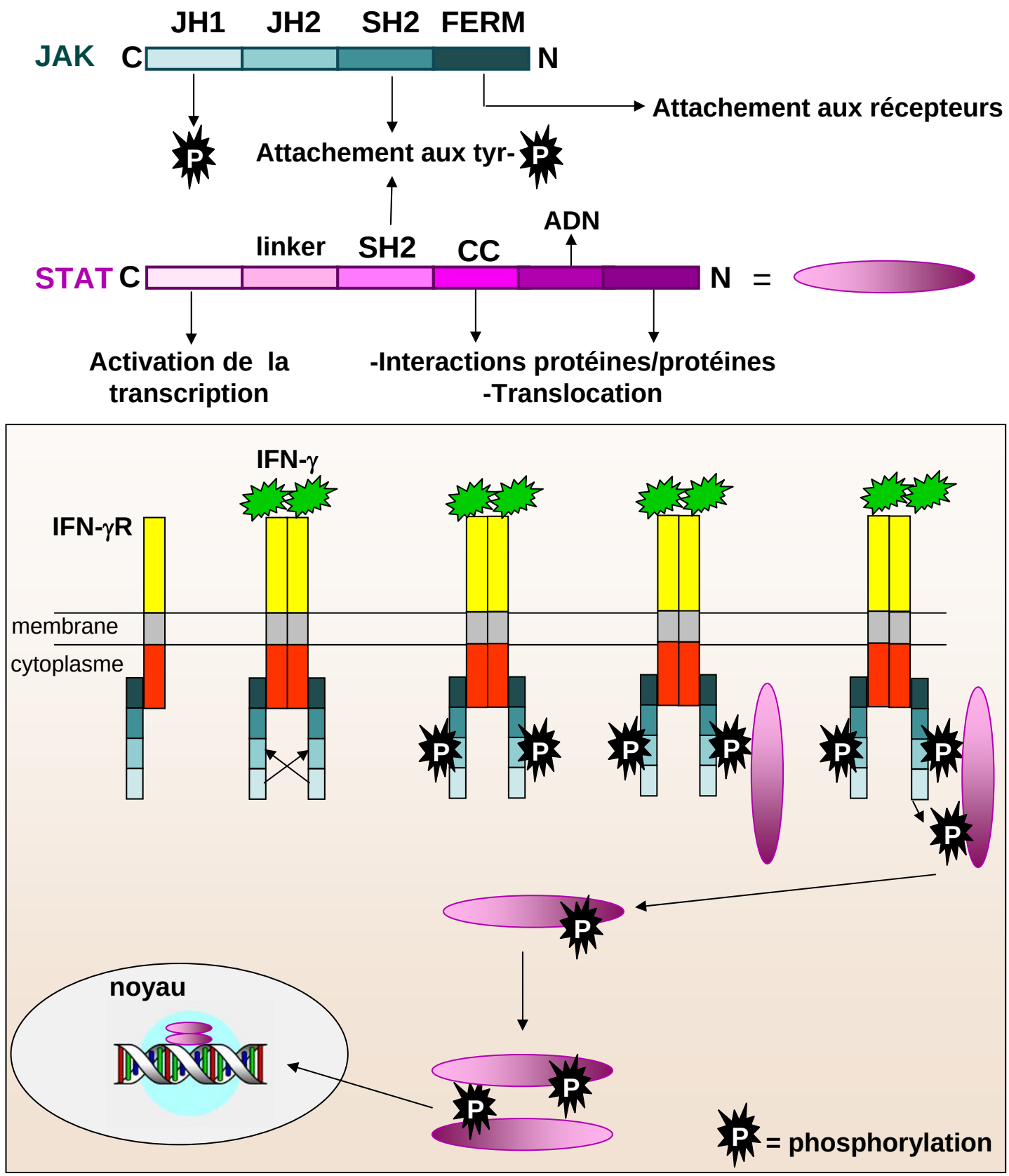
I-3-3. Les Ig

Les Ac ou Ig sont des glycoprotéines produites par les LB constituées de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes et deux chaînes légères qui sont reliées entre elles par des ponts disulfures. Chaque chaîne légère est constituée d'une région variable et d'une région constante (Carlisle MS et coll., 1991). Les chaînes lourdes, quant à elles, sont composées d'une région variable et de 3 ou 4 régions constantes. La fixation à l'antigène s'effectue sur le site formé par les régions variables des deux chaînes.

Selon la séquence en acides aminés de la région constante des chaînes lourdes et la fonction immunitaire, on distingue plusieurs classes d'Ac :

- Les IgG sont les plus abondantes. Elles représentent 75 à 80 % des anticorps totaux. Elles protègent l'organisme contre les bactéries, les virus, et les toxines qui circulent dans le sang et la lymphe. La région constante des IgG permet de fixer le complément, de lier l'Ac aux cellules phagocytaires, et de traverser l'épithélium.
- Les IgA sont sécrétées principalement au niveau des muqueuses (salive, suc intestinal, sueur) et leur production dans le sang est réduite. Elles se présentent sous forme dimérique. Leur rôle est d'empêcher les agents pathogènes de se lier à la cellule et plus spécifiquement aux cellules de recouvrement constituant les muqueuses et l'épiderme.
- Les IgM, IgD et IgE sont faiblement synthétisées. Les IgM sont sécrétées lors du premier contact de l'organisme avec un antigène et se présentent sous forme de pentamère. C'est la première classe d'Ig libérée par les plasmocytes. La présence d'IgM dans le sang indique une infection en cours. Les IgD sont le plus souvent attachées à la surface des LB où elles jouent un rôle de récepteurs des antigènes. Elles interviendraient dans la maturation des lymphocytes. Les IgE sont plus volumineuses que les IgG. Elles sont sécrétées au niveau des

Figure 3: La voie de signalisation JAK/STAT



Les récepteurs de l'IFN-γ se dimérisent après fixation du ligand. Les cascades de phosphorylations JAK-dépendantes induisent l'activation de STAT, qui passe dans le noyau sous forme de dimère pour induire la transcription.

muqueuses, des voies digestives et des voies respiratoires. Dès la capture d'un antigène, l'IgE active des mastocytes qui libèrent des médiateurs inflammatoires (histamine et sérotonine) entrainant des réactions allergiques.

I-3-4. Le complément

Le système du complément est un ensemble de protéines circulantes, principalement sécrétées par le foie. Leur rôle est de complémenter l'action des Ig. Le système du complément possède plusieurs fonctions importantes dont la principale est la lyse d'agents pathogènes. Il existe trois voies biochimiques qui activent le système du complément : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines.

La voie classique est activée par le complexe antigène-anticorps. Seules les IgG1, IgG2, IgG3 et IgM sont capables d'entrainer la cascade biochimique d'activation. Le complexe C1 (formé de C1q, C1r, C1s) du complément va fixer la chaîne lourde des Ig ayant fixées l'antigène. La voie alterne et la voie des lectines sont directement et respectivement activées par les bactéries et par des résidus mannose des micro-organismes.

Toutes ces voies aboutissent à la formation d'une C3 convertase, point de départ de la voie effectrice dite tardive. Cette dernière conduit à la formation d'un complexe lytique qui s'insère dans les membranes des bactéries et forme un canal par lequel l'eau pénètre et détruit les bactéries.

Le système du complément assure également l'activation du système immunitaire notamment par les petits fragments pro-inflammatoires. Ces derniers sont obtenus lors de la cascade biochimique aboutissant à l'activation du complément, l'opsonisation de certains agents pathogènes permettant leur phagocytose et le métabolisme des complexes immuns circulant grâce aux récepteurs des fragments du complément.

I-4. LA RÉPONSE IMMUNE INNÉE INTESTINALE

La réponse non-spécifique mucosale intestinale est composée de plusieurs lignes de défense. Les mécanismes de défense innés font intervenir des composantes physiques, microbiologiques et cellulaires.

I-4-1. Le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal comprend environ 10^{14} bactéries réparties en plus de 1000 espèces différentes dont la plupart sont des bactéries à Gram positif et vivent en anaérobiose. Les

espèces bactériennes dominantes appartiennent au genre *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus* et *Clostridium* (Zoetendal EG et coll., 2006).

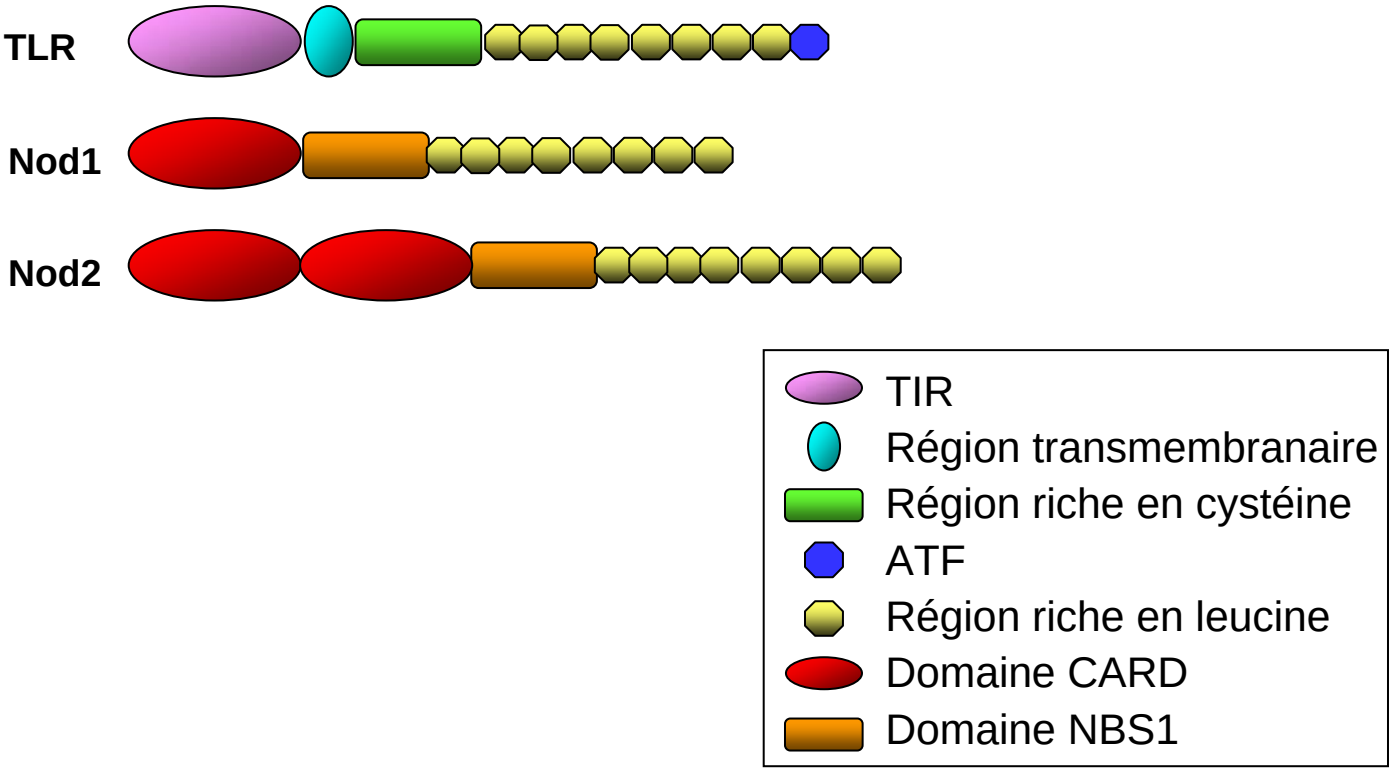
Le microbiote intestinal joue un rôle important dans les fonctions de l'intestin, en exerçant différentes actions protectrices, structurales et métaboliques. Il permet de protéger l'hôte contre les infections en empêchant la colonisation du tube digestif par les bactéries pathogènes. Cet effet barrière s'exerce à plusieurs niveaux : *i*) une compétition pour les nutriments, *ii*) une occupation des sites de colonisation situés sur l'épithélium intestinal notamment par les bactéries lactiques qui adhérent, même mortes, aux cellules intestinales, empêchant ainsi la fixation de bactéries pathogènes (Chauviere G et coll., 1992) et *iii*) en induisant la production de molécules antimicrobiennes (lysozyme, la phospholipase A_2 et les défensines) par les cellules épithéliales (Lievin-Le Moal V and Servin AL, 2006).

Enfin, le microbiote intestinal permet le maintien de l'homéostasie de la réponse inflammatoire. Les cellules épithéliales sont constamment exposées aux microorganismes commensaux. De façon assez surprenante, la quantité de bactéries présentes ne provoque pas d'inflammation de la muqueuse intestinale en conditions physiologiques. Il semble donc que la réponse immunitaire innée soit sévèrement régulée pour éviter une inflammation chronique. L'ensemble des mécanismes de régulation impliqués n'a pas encore été identifié, mais le rôle de certaines voies de signalisation a été démontré. À titre d'exemple, les bactéries commensales peuvent inhiber la lyse protéosomale de I-κB, empêchant la translocation de NF-κB et avoir ainsi un rôle anti-inflammatoire (Neish AS et coll., 2000). Par ailleurs, *B. thetaiotaomicron* inhibe la production d'IL-8 induite par *E. coli* O157:H7 ainsi que le recrutement des leucocytes par *S. enteritidis*. En fait, *B. thetaiotaomicron* favorise l'export de NF-κB en association avec le facteur anti inflammatoire 'peroxisome proliferator-activated receptor-γ' hors du noyau (Kelly D et coll., 2004).

I-4-2. Le mucus

L'épaisseur et la composition de la couche de mucus qui tapisse la surface microvillositaire contribuent à la défense de la muqueuse contre l'adhésion et la pénétration des toxines et bactéries. La production de mucus par les cellules caliciformes peut augmenter sous l'action de l'histamine produite par les mastocytes, et des lymphokines produites par les LT sensibilisés au cours de l'infection intestinale. La couche de mucus représente une barrière physicochimique contre la diffusion des micro-organismes. Sa richesse en radicaux sialates et sulfates électronégatifs constitue une barrière anionique contre la pénétration des germes. Par

Figure 4: Structure schématique des TLR et des Nod



ailleurs, le mucus semble contenir des fractions carbohydrates présentant des analogies de structure avec les glycoprotéines spécifiques de la surface microvillositaire sur lesquelles se lient certaines bactéries comme *E. coli* (Kerneis S et coll., 1994); ainsi, les micro-organismes vont fixer ces structures du mucus et vont moins adhérer à la surface des entérocytes.

I-4-3. La phagocytose

La phagocytose est un processus de reconnaissance, de captation et de digestion des particules étrangères par des cellules spécialisées, les phagocytes. Les phagocytes sont composés à 70% des granulocytes neutrophiles, 5% des monocytes et 1,5% des granulocytes éosinophiles.

La phagocytose comprend trois grandes étapes : *i*) le chimiotactisme qui permet le déplacement du phagocyte vers la bactérie grâce à une attraction chimique exercée par de nombreux facteurs, *ii*) l'adhésion de la membrane du phagocyte à celle de la bactérie ; ce processus est favorisé par la présence de nombreux pseudopodes mobiles à la surface des phagocytes, et *iii*) l'endocytose, étape durant laquelle une expansion cytoplasmique englobe progressivement la bactérie qui se trouve finalement incluse dans une vacuole, le phagosome.

Trois évolutions sont possibles : soit la bactérie est digérée par des lysosomes contenus dans le phagocyte, soit la bactérie reste en *statu quo* sans se multiplier dans le phagocyte, soit la bactérie résiste à la phagocytose, se multiplie et détruit le phagocyte. C'est notamment le cas de nombreuses bactéries entéroinvasives telles que *Shigella, Yersinia, Salmonella* ou *Listeria* (Sansonetti PJ et coll., 1986; Lindgren SW et coll., 1996; Birmingham CL et coll., 2008).

I-4-4. Activation et réponse des cellules

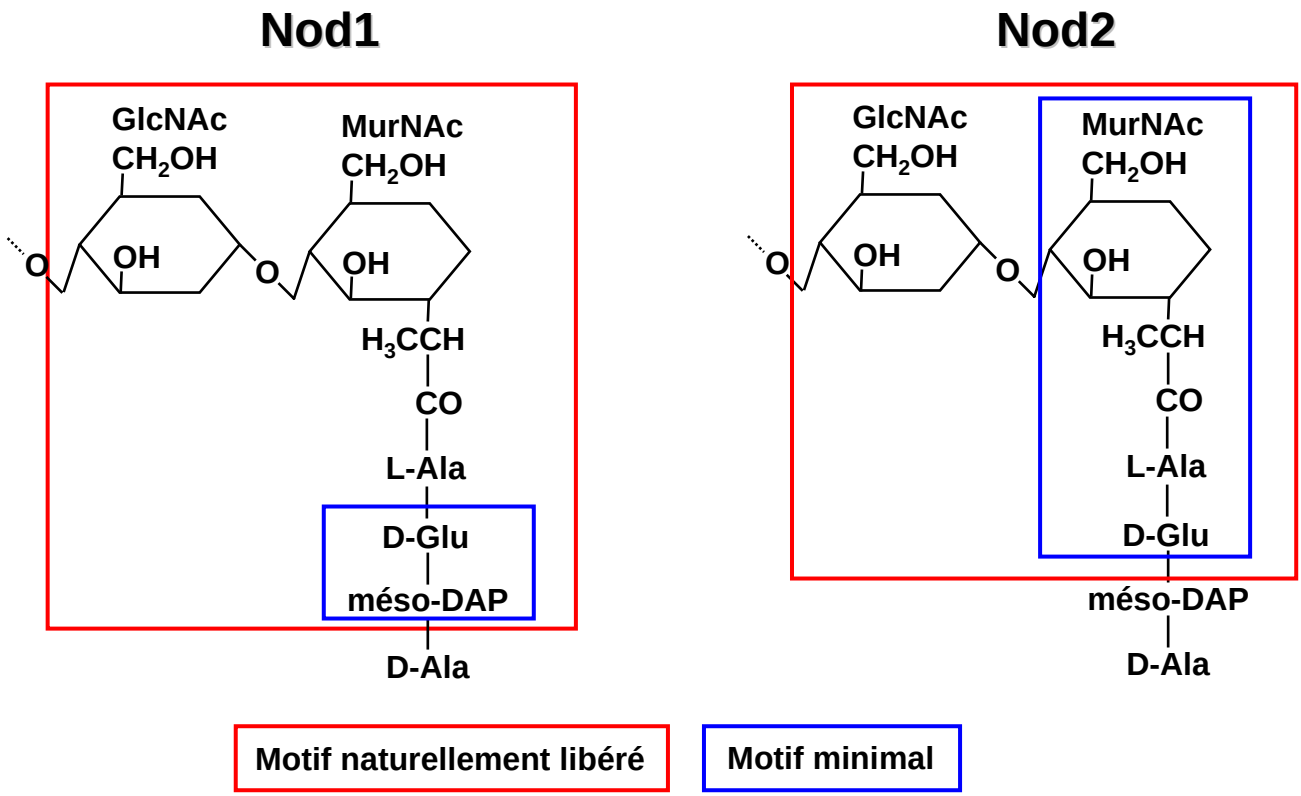
I-4-4-a. Les récepteurs cellulaires

L'adhésion bactérienne et/ou la fixation des produits de sécrétion bactériens sur les récepteurs des entérocytes et des cellules myéloïdes est capitale pour l'initiation de la réponse immunitaire. Par ailleurs, l'activation de ces récepteurs va permettre l'induction d'une réponse innée qui va se traduire par la synthèse d'effecteurs antimicrobiens.

- **Récepteurs extracellulaires**

Certains récepteurs de surface sont communs aux entérocytes et aux cellules myéloïdes. Ce sont principalement les récepteurs TLR (pour toll-like receptor ; Fig. 4). La plupart des espèces de mammifères ont entre dix et quinze types de TLR. Treize TLR ont été identifiés chez l'homme et la souris. Les TLR apparaissent sous la forme d'homodimères sauf TLR2 qui

Figure 5: Motifs du peptidoglycane reconnus par Nod1 et Nod2



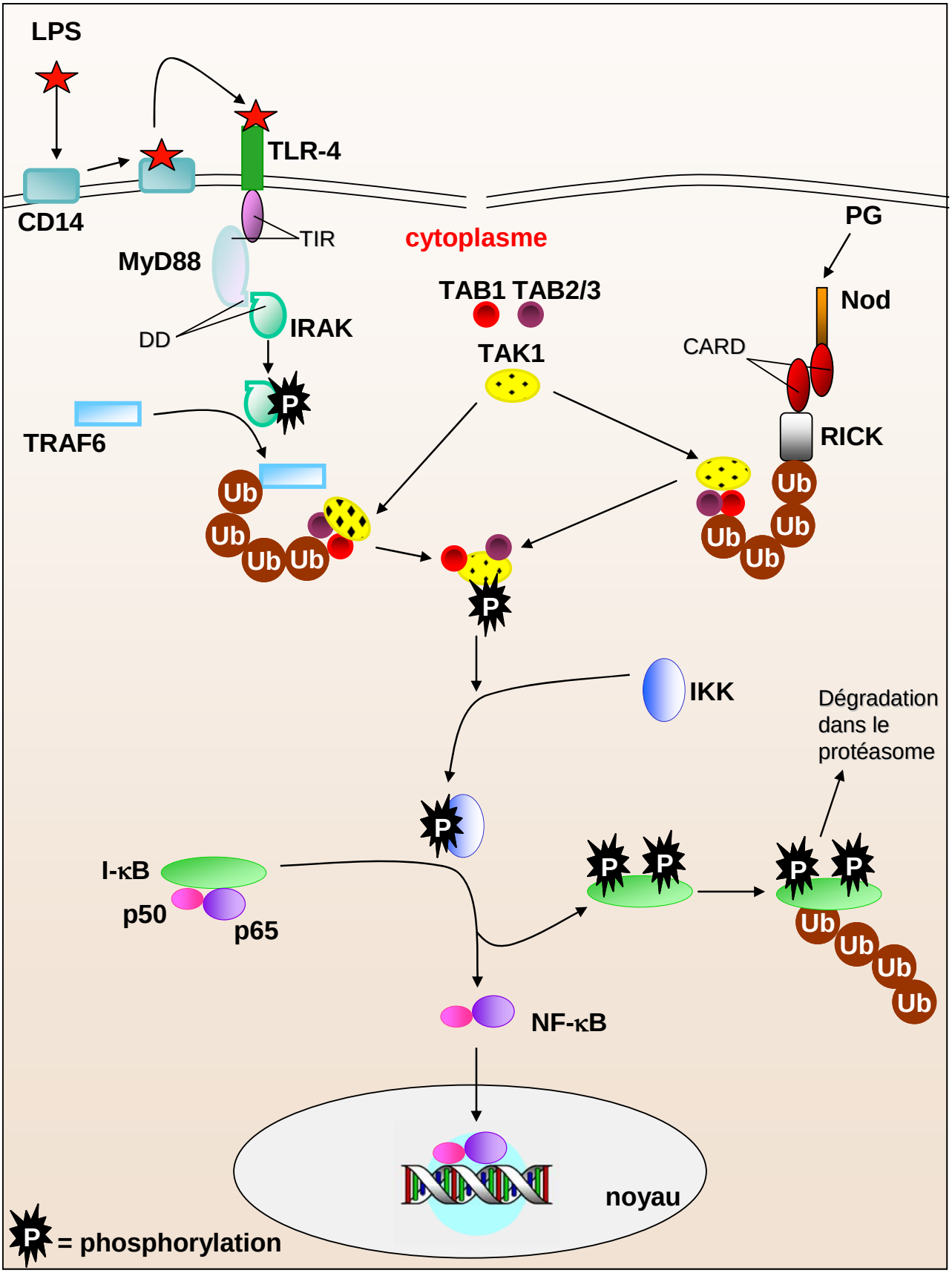
présente la particularité de s'associer en hétérodimère avec TLR1 ou TLR6. Les agonistes des différents TLR sont les suivants (Travassos LH et coll., 2004; Yamamoto M et coll., 2004) : TLR1 : co-récepteur de TLR2 pour les triacyls ; TLR2 : acide lipotéchoïque de différentes bactéries selon son association avec TLR1 ou 6 ; TLR3 : ARN double brin viral ; TLR4 : lipopolysaccharide (LPS) ; TLR5 : flagelline ; TLR6 : co-récepteur de TLR2 pour les diacyls ; TLR7 et TLR8 : ARN simple brin et molécules anti-virales de la famille des imidazoquinolines ; TLR9 : séquences oligonucléotidiques CpG non méthylées ; TLR10-13 : ligands inconnus.

Il faut cependant noter que les entérocytes n'expriment peu ou pas les récepteurs TLR2 et TLR4 à leur surface, expliquant en partie la tolérance vis à vis des bactéries commensales à Gram négatif. Néanmoins, le niveau d'expression des gènes codant pour TLR2 et TLR4 et le nombre de récepteurs TLR2 et 4 sont augmentés lors de maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) humaines (Hausmann M et coll., 2002; Szebeni B et coll., 2008); ce mécanisme serait responsable en partie du maintien de l'inflammation chez les patients. Par ailleurs, TLR5 est exprimé exclusivement du côté basolatéral des entérocytes (Gewirtz AT et coll., 2001); de ce fait, seules les bactéries pathogènes qui franchissent la barrière épithéliale peuvent induire une réaction inflammatoire.

- **Récepteurs intracellulaires**

Au début des années 2000, de nouveaux récepteurs intracellulaires ont été caractérisés, les récepteurs Nod (pour nucleotide-binding oligomerization domain ; Fig. 4). Nod1 (ou CARD4) et Nod2 (ou CARD15) sont exprimés respectivement dans les cellules épithéliales et dans les macrophages (Girardin SE et coll., 2001; Inohara N et coll., 2001). Néanmoins, l'expression de Nod2 peut être induite dans les entérocytes en réponse à des cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de la présence de Nod2 dans les cellules épithéliales a été observée lors de MICI humaines (Rosenstiel P et coll., 2003). Ces récepteurs sont des senseurs intracellulaires de peptidoglycanes bactériens. La structure minimale du peptidoglycane reconnue par Nod1 est le dipeptide N-acétyl-L-glucosamine/méso-diaminopimelate (Fig. 5 ; Girardin SE et coll., 2003) ; la présence de l'acide méso-diaminopimélique est caractéristique de la plupart des bactéries à Gram négatif et de quelques bactéries à Gram positif du genre *Bacillus* et *Listeria*. En revanche, Nod2 reconnaît à la fois les peptidoglycanes des bactéries à Gram positif et à Gram négatif ; la structure détectée est le muramyl-N-acétyl-L-alanine-D-glucosamine (Fig. 5 ; Girardin SE et coll., 2003). Ces récepteurs sont donc essentiels pour détecter la présence de bactéries entéropathogènes invasives telles que *S. flexneri* (Girardin

Figure 6: Activation de NF-κB par les voies TLR et Nod



Des cascades de phosphorylations et d'ubiquitinations induites par la fixation de LPS par TLR-4 ou de PG par Nod permettent la phosphrylation de I-κB et la libération de NF-κB. Ce facteur passe dans le noyau et initie la transcription de gènes inductibles.

SE et coll., 2001). Cependant, il a été récemment décrit que la bactérie non invasive *Helicobacter pylori* peut induire une signalisation via Nod1 (Viala J et coll., 2004); les auteurs ont proposé que le peptidoglycane pénètre dans la cellule hôte en utilisant le système de sécrétion de type IV. Enfin, des variants de Nod2 ont été associés à la maladie de Crohn, une MICI humaine dont l'étiologie n'a pas encore été établie. Deux mutations, Arg702Trp and Gly908Arg, ont été respectivement retrouvées chez 11 et 6 % des sujets atteints de maladie de Crohn contre 4 et 1 % chez des sujets contrôles (Hugot JP et coll., 2001). De plus, l'insertion d'une cytosine dans l'exon 11 au nucléotide 3020 a été observée respectivement chez 12 et 2% des patients Crohn et des sujets contrôles (Ogura Y et coll., 2001). Ces senseurs mutés ne peuvent plus répondre à la stimulation bactérienne et n'activent plus le facteur de transcription NF-κB. Cette perte de la surveillance par Nod2 pourrait *i*) résulter en l'incapacité des réponses immunitaires de la muqueuse intestinale à contrôler d'autres infections bactériennes, *ii*) induire une réponse massive à d'autres composés bactériens dont le LPS, *iii*) induire une sur-activation de la réponse immune cellulaire et/ou adaptative, ou *iv*) moduler l'apoptose des cellules. L'ensemble de ces phénomènes participerait ainsi au développement de MICI.

I-4-4-b. La transduction du signal

Après leur activation par les produits d'origine bactérienne, les récepteurs cellulaires vont initier l'activation de voies de signalisation dans les cellules. Cette transduction du signal va aboutir à l'activation de facteurs de transcription qui vont initier la transcription de gènes inductibles de l'immunité. Il existe de très nombreuses voies de signalisation qui agissent indépendamment les unes des autres, en synergie ou en opposition ; elles permettent l'activation d'un ou plusieurs facteurs de transcription impliqués dans l'expression de gènes codant pour des effecteurs de la réponse innée. À titre d'exemple, nous présenterons l'activation de NF-κB en réponse à une stimulation par TLR4 ou par Nod (Fig. 6).

Le domaine TIR du récepteur TLR4 interagit avec une molécule cytoplasmique contenant elle-même un domaine TIR à une extrémité, le facteur MyD88. Cette molécule contient à l'autre extrémité amino-terminale un domaine de mort (DD pour death domain) par l'intermédiaire duquel elle interagit avec les sérine-thréonine kinases à domaine DD de la famille IRAK. Cette dernière s'autophosphoryle suite à cette interaction, se libère du complexe récepteur puis catalyse la polyubiquitination du facteur TRAF6. La polyubiquitination de TRAF6 lui permet d'interagir avec la sérine-thréonine kinase TAK1 via les protéines accessoires TAB. TAK1 est phosphorylé/activé et active à son tour le complexe

I-κB kinase (IKK composé des trois sous-unités α, β et γ) en phosphorylant les sous-unités α et β (Zandi E et coll., 1997; Delhase M et coll., 1999; Deng L et coll., 2000; Krappmann D et coll., 2000). La sous-unité IKKβ devient alors une kinase active qui phosphoryle IκB, l'inhibiteur cytoplasmique de NF-κB. IκB est alors polyubiquitinylé et dégradé dans le protéasome. Le facteur de transcription NF-κB est libéré et peut transloquer dans le noyau afin d'induire la transcription des gènes.

La kinase TAK1 est également essentielle à l'activation de NF-κB par Nod. Lorsque le récepteur Nod fixe son ligand, son domaine CARD se lie au domaine CARD de la kinase RICK. Cette dernière est alors polyubiquitinylée et fixe TAK1 via TAB (Hasegawa M et coll., 2008). Il en suit, alors, une cascade de signalisation identique à celle décrite ci-dessus. Il faut cependant noter que le complexe IKK se fixe par IKKγ sur la protéine RICK ; TAK1 phosphoryle IKKβ sur ce complexe multi-enzymatique et IKK activé se détache pour phosphoryler IκB (non montré sur la fig. 6).

I-4-4-c. Les effecteurs de la réponse innée

Suite à l'activation par les produits des pathogènes, les cellules épithéliales et/ou les cellules myéloïdes vont exprimer des gènes inductibles codant pour des effecteurs de la réponse immune innée. Ces effecteurs ont pour but d'attirer et d'activer d'autres cellules de la réponse immune au site de l'infection (chimiokines, cytokines) ou de détruire directement les agents infectieux. Il existe de nombreuses molécules effectrices et nous ne présentons dans ce paragraphe que quelques exemples.

- **Le TNF-α**

Le TNF-α est une des cytokines pro-inflammatoires de la réponse non-spécifique. Dans l'intestin, le TNF-α est associée à de nombreuses pathologies telles que la maladie de Crohn. De nombreuses études cliniques utilisant des anticorps monoclonaux visant à neutraliser le TNF-α sont réalisées dans la lutte contre la maladie de Crohn (Sandborn WJ and Loftus EV, 2004). Cependant, le TNF-α peut jouer un rôle bénéfique notamment dans le contrôle de bactéries pathogènes au niveau intestinal. Il a été montré que des souris TNFRp55 déficientes pour le récepteur du TNF-α sont plus sensibles à l'infection par *Citrobacter rodentium* et ont une réponse Th1 diminuée ce qui démontre que le TNF-α joue un rôle crucial dans la multiplication de *C. rodentium* au niveau intestinal et dans le développement de la réponse Th1 (Goncalves NS et coll., 2001).

- **Un médiateur lipidique**

Sous l'action de la phospholipase A2, l'acide gras arachidonique est libéré par dénaturation des phospholipides des membranes cellulaires. Les prostaglandines sont des dérivés eicosanoïdes issus de l'action de la cyclo-oxygénase (COX) sur cet acide arachidonique. On distingue la COX-1, d'expression constitutive et ubiquitaire, de la COX-2 dont l'expression est inductible en réponse à des bactéries pathogènes ou dans des tissus enflammés. Les prostaglandines favorisent la vasodilatation et inhibent l'activation des LT Th1 (Meyer F et coll., 2003). D'autre part, il a été montré que *Mycobacterium avium* induisait COX-2 dans des macrophages murins entraînant la production de metalloprotéinases responsables du développement de la pathologie (Basu S et coll., 2007).

- **Facteurs oxydants**

Parmi ces effecteurs, les enzymes produisant des dérivés réactifs de l'azote et l'oxygène ont été bien caractérisées. Les dérivés de l'azote, dont le monoxyde d'azote (NO), seront décrits dans le chapitre II. Les dérivés de l'oxygène sont produits à partir d'un complexe enzymatique, la NADPH oxydase, associé à la membrane cytoplasmique ou aux phagosomes et qui produit l'anion radicalaire superoxide (O_2^-) à partir de l'oxygène ; cet anion possède un fort potentiel oxydant qui le rend cytotoxique pour de nombreux agents pathogènes mais également pour les cellules productrices. La superoxide dismutase métabolise O_2^- en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) reconnu pour ses effets bactériotoxiques ; la superoxide dismutase permet également de limiter les oxydations induites par O_2^-. Enfin, la myéloperoxydase synthétise de l'acide hypochloreux (HOCl) à partir de H_2O_2 et de Cl^- ; cette enzyme est principalement induite dans les neutrophiles et permet la destruction des bactéries.

Il est important de noter qu'une production inadaptée des effecteurs de la réponse immune innée peut être à l'origine de symptômes inflammatoires. A ce titre, il a été démontré que les dérivés réactifs de l'oxygène sont produits dans la muqueuse colique de patients atteints de maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse (Kruidenier L et coll., 2003) et participe au maintien des troubles pathophysiologiques (Yamada T and Grisham MB, 1991).

I-5. LA RÉPONSE IMMUNE SPÉCIFIQUE INTESTINALE

La réponse immunitaire spécifique contre la plupart des protéines est dépendante des LT $CD4^+$. Plusieurs types de réponses immunitaires principales peuvent être générés par les lymphocytes T $CD4^+$. Ces réponses sont dépendantes du type de cellules présentant

l'antigène, des cytokines présentes lors de la stimulation initiale des $CD4^+$ et/ou de l'affinité de la liaison antigène/CMH II. Nous présentons dans les paragraphes suivants les principales caractéristiques des différentes lignées de cellules T dans le contexte de la muqueuse intestinale.

I-5-1. La balance Th1/Th2

Lorsqu'un macrophage, une cellule dendritique ou une cellule épithéliale intestinale présente des peptides antigéniques aux lymphocytes T $CD4^+$ et produit de l'IL-12, les LT $CD4^+$ évoluent vers une réponse de type Th1. Ces derniers produisent à leur tour de l'IL-2 et de l'IFN-γ qui stimulent et permettent la prolifération des LT $CD4^+$ et $CD8^+$ et des cellules mononuclées.

En revanche, les LT $CD8^+$ ne semblent pas essentiels à la réponse immune intestinale lors d'infection par des bactéries. Ainsi, des souris sans cellules CD4, mais avec des cellules CD8, sont plus sensibles à l'infection par *Citrobacter rodentium*, une bactérie entéropathogène de la souris, et développent une inflammation du côlon plus importante que les souris contrôles (Simmons CP et coll., 2003).

Lors d'une infection par des bactéries pathogènes, la réponse Th1 de la muqueuse intestinale est le plus souvent induite. Ainsi, des nombreux infiltrats de LT $CD4^+$ de type Th1 sont observés dans les muqueuses gastriques humaines et coliques murines respectivement infectées par *Helicobacter pylori* (Bamford KB et coll., 1998) et *C. rodentium* (Higgins LM et coll., 1999) ; de plus, il a été observé une importante augmentation de l'expression des ARNm codant pour des cytokines de type 1 dans les côlons de souris infectées par *C. rodentium* en comparaison des animaux sains (Gobert AP et coll., 2004). La réponse Th1 permet de lutter efficacement et rapidement contre les agents pathogènes. Néanmoins, la persistance de cette réponse peut empêcher le développement d'une réponse Th2 et donc d'une immunité adaptative et est à l'origine des inflammations chroniques de la muqueuse intestinale. Ainsi, le transfert adoptif de cellules $CD4^+$ produisant de l'IFN-γ et de l'IL-2 (cellules Th1 actives) dans des souris SCID, qui présentent une lymphopénie profonde, induit une colite (Cong Y et coll., 1998). Cette dernière est alors caractérisée par une inflammation de toute la muqueuse intestinale identique à celle observée chez des patients souffrant de maladie de Crohn (Fuss IJ et coll., 1996). Il est donc actuellement proposé à des patients atteints de maladie de Crohn un traitement avec un Ac anti-IL-12 ; ce traitement induit des réponses cliniques favorables et, est associé avec une diminution de la production de cytokines de type 1 dans la muqueuse intestinale (Mannon PJ et coll., 2004).

La stimulation des LT $CD4^+$ peut également aboutir à l'activation de la lignée Th2. Dans le cadre de la réponse Th2, les LB peuvent jouer un rôle prépondérant en tant que cellules présentant l'antigène aux LT $CD4^+$; l'épitope est cependant différent puisque la partie liée aux LB est masquée aux TCR du LT $CD4^+$. Les cytokines de type 2 favorisent la transformation des LB en plasmocytes sécréteurs d'Ac, assurant ainsi une immunisation efficace à long terme contre les agents pathogènes. Par ailleurs, la réponse Th2 possède un effet anti-inflammatoire reconnu. Ainsi, des souris invalidées pour le gène codant pour l'IL-10 développent spontanément une colite chronique aux caractéristiques histopathologiques semblables à celles des MICI ; la suractivation des LT de type 1 dans la muqueuse du côlon de ces animaux est majoritairement responsable du développement de l'inflammation (Davidson NJ et coll., 1996). De la même manière, le traitement d'animaux présentant des colites expérimentales chimio-induites, par le dextran sulfate de sodium (DSS) ou par l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS), par des cytokines de type 2 permet la réduction de l'inflammation (Saubermann LJ et coll., 2002). Enfin, une augmentation trop importante de la production de cytokines de type 2 est impliquée dans le développement des pathologies allergiques et de la colite ulcéreuse (Fuss IJ et coll., 1996).

L'équilibre entre les deux sous populations de lymphocytes T permet donc de maintenir une homéostasie fonctionnelle générant une réponse immunitaire appropriée. En effet, chacune des lignées Th1/Th2 exerce un contrôle négatif sur l'activité de l'autre ; c'est ainsi que l'IL-4 est un puissant inhibiteur du développement de la lignée Th1, alors que l'IFN-γ contribue de la même manière à freiner le développement de la lignée Th2. Le déséquilibre de la balance Th1/Th2 permet une réponse immune appropriée. Néanmoins, cette dérégulation à long terme peut conduire à l'apparition de pathologies chroniques.

I-5-2. La réponse Th17

Des pathogènes du tube digestif tels que *H. pylori* et *C. rodentium* induisent la production d'IL-17 par les muqueuses infectées (Mangan PR et coll., 2006; Algood HM et coll., 2007). L'implication de la réponse Th17 *in vivo* sur l'infection par *C. rodentium* a été réalisée par Mangan et coll. qui ont démontré une augmentation de la colonisation et de la mortalité dans des souris déficientes pour les gènes codant pour l'IL-23 après infection par *C. rodentium* en comparaison des souris sauvages (Mangan PR et coll., 2006). En revanche, les dommages histologiques intestinaux sont moins marqués chez les souris knock-out pour l'IL-23 (Mangan PR et coll., 2006). Ces résultats suggèrent que la réponse immune intestinale Th17 est efficace pour lutter contre les infections bactériennes mais concourent également au développement de

l'inflammation. Cette dernière hypothèse a été plus récemment validée par deux études : *i*) La colite spontanée observée chez des souris knock-out pour l'IL-10 est diminuée chez des souris KO pour l'IL-23 et non pour l'IL-12. Inversement, l'administration d'IL-23 favorise le développement de l'inflammation *via* la production d'IL-17 et d'IL-6 mais pas d'IFN-γ ni d'IL-4 (Yen D et coll., 2006) ; *ii*) Le développement d'une colite induite par transfert de cellules T activées par des antigènes bactériens dans des souris SCID a été supprimé chez des animaux préalablement traités par un Ac monoclonal anti-IL-23 (Elson CO et coll., 2007).

I-5-3. Les lymphocytes Treg

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ne sont pas seulement la conséquence d'une activation inappropriée du système Th1 mais également le résultat d'une dysfonction des Treg (Liu H et coll., 2003). Ainsi, le transfert de cellules $CD4^+CD25^+$ chez des souris présentant une colite expérimentale dépendante des LT induit *i*) une prolifération des Treg dans les ganglions mésentériques et dans le côlon et *ii*) une inhibition de l'inflammation (Mottet C et coll., 2003). Il a par ailleurs été observé une prolifération des Treg dans la *lamina propria* et les ganglions mésentériques de patients souffrant de colite ulcéreuse (Yu QT et coll., 2007), soulignant que les Treg ne sont peut-être pas protecteurs *in vivo* chez l'homme. En revanche, Maul et coll. ont décrit que les populations de cellules $Foxp3^+$ augmentent lors des périodes de rémission chez des patients atteints de maladie de Crohn (Maul J et coll., 2005). De même, des transferts de cellules T $CD25^+$ ou $CD25^-$ dans des souris athymiques ont permis de démontrer le rôle anti-inflammatoire des Treg lors de la gastrite à *H. pylori*, néanmoins associé avec une augmentation de la colonisation (Raghavan S et coll., 2003).

L'implication du microbiote commensal intestinal sur le développement des cellules Treg a par ailleurs été recherchée. Des souris SCID ayant reçu les LT $CD4^+$ de souris conventionnelles ont développé moins rapidement et moins fortement une colite que les souris traitées par les cellules des souris axéniques ; cet effet a été associé à un profond déficit en cellules Treg parmi la population de LT $CD4^+$ dans les souris axéniques (Strauch UG et coll., 2005). Des observations similaires ont été effectuées plus récemment : un transfert adoptif de LT $CD4^+$ de souris SAMP1/YitFc, qui développent spontanément une inflammation de l'iléum, dans des souris SCID provoque l'apparition d'une iléite. Lorsque les souris donneuses sont axéniques, l'inflammation induite dans les souris receveuses est plus importante et le gène *foxp3* est moins exprimé dans les LT $CD4^+$ en comparaison des souris donneuses conventionnelles (Bamias G et coll., 2007). Ces données suggèrent que les

antigènes des bactéries commensales sont nécessaires à la génération et/ou l'expansion de LT $CD4^+CD25^+$ au niveau intestinal.

I-5-4. La réponse humorale intestinale

Au niveau intestinal, la différenciation des LB aboutit à la formation de plasmocytes orientés vers la production d'IgG et d'IgM, et principalement d'IgA sécrétoires. Celles-ci représentent la classe d'Ac la plus importante dans les fluides. Les IgA sécrétoires sont composées d'IgA dimériques ou polymériques liées ensemble par une association covalente. Elles inhibent l'absorption des micro-organismes, antigènes et toxines en formant avec eux des complexes immuns qui restent dans la lumière intestinale ou sont trappés dans le mucus, empêchant ainsi leur absorption. Les souris dépourvues de microbiote intestinal ont un nombre diminué de plasmocytes sécréteurs d'IgA par rapport à des animaux conventionnels (Moreau MC and Corthier G, 1988) ; il a été par ailleurs suggéré que les antigènes des bactéries commensales sont nécessaires pour induire une réponse humorale classique spécifique d'autres antigènes (Macpherson AJ et coll., 2001).

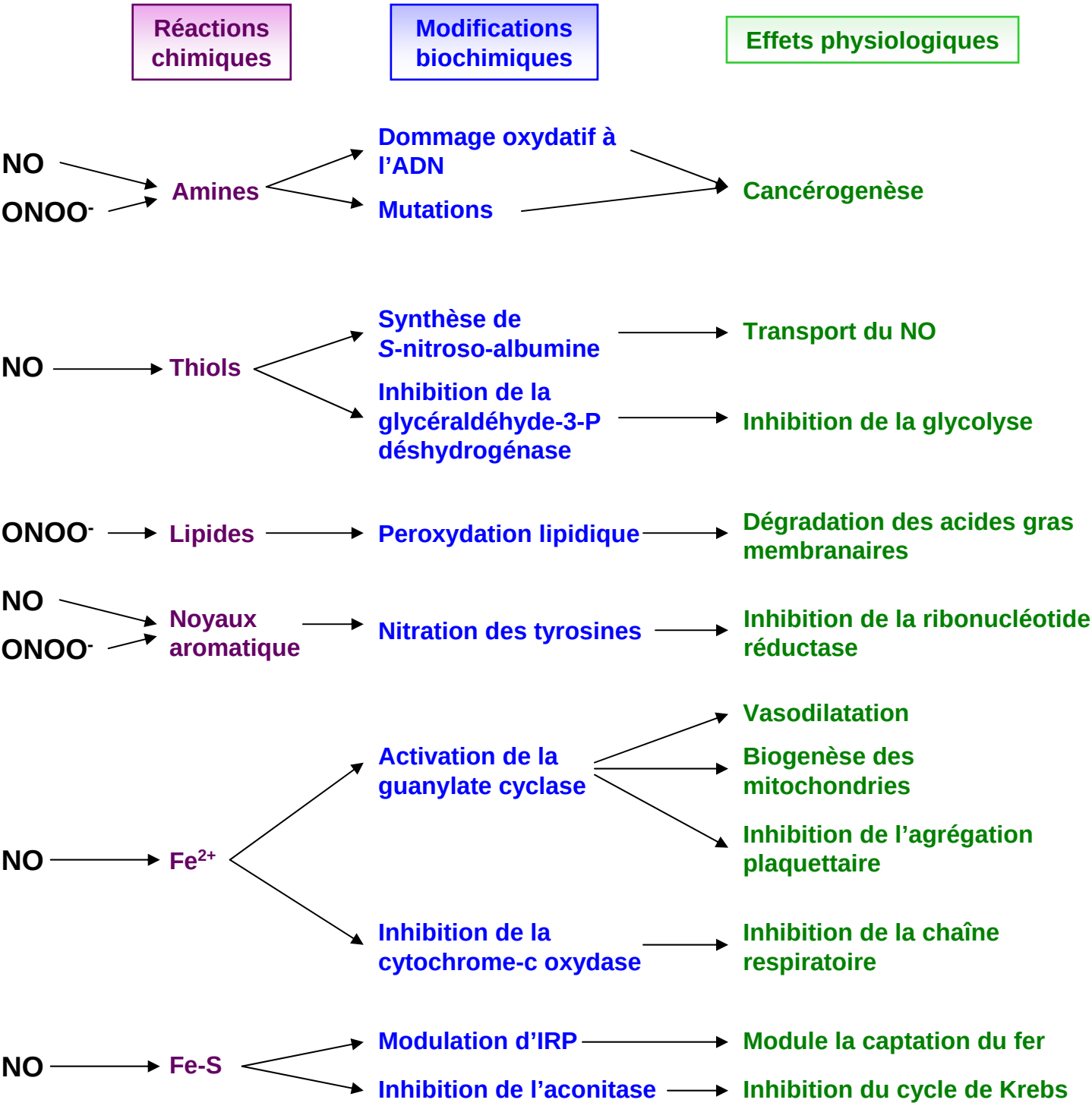
II. LE MONOXYDE D'AZOTE

Le NO est une molécule diatomique radicalaire, ce qui lui confère de nombreuses propriétés chimiques ; de ce fait, NO peut agir sur de nombreuses molécules des systèmes vivants. Dans les milieux biologiques, NO est produit à partir de la L-arginine par plusieurs isoformes de l'enzyme NO synthase (NOS). La synthèse de NO a lieu dans de nombreux types cellulaires, expliquant son implication dans une très large variété de fonctions biologiques. **Mais plus particulièrement, NO est un agent incontournable de la réponse immune innée en agissant comme un agent antimicrobien et en modulant les processus inflammatoires.**

II-1. PROPRIÉTÉS CHIMIQUES DE NO

NO possède un électron célibataire qui lui confère son état radicalaire et sa très forte réactivité sur de nombreuses espèces organiques et inorganiques. Le potentiel d'oxydoréduction du milieu environnant est déterminant pour l'oxydation de NO en cation nitrosonium (NO^+) ou pour sa réduction en anion nitrosyl (NO^-).

Figure 7: Les principales propriétés chimiques et biochimiques de NO



NO, contrairement à la plupart des radicaux libres, ne se dimèrise et ne se dismute pas. Sa réactivité dépend essentiellement de ses capacités à partager son électron célibataire avec d'autres radicaux (ion superoxyde, radical tyrosyl), avec des espèces susceptibles d'intervenir dans des réactions radicalaires (oxygène moléculaire, thiols, phénols) ou encore avec des métaux de transition avides d'électrons (fer, cuivre). Toutes ces réactions chimiques confèrent au NO de nombreuses propriétés biochimiques et physiologiques (Fig. 7).

II-1-1. Réactions avec l'oxygène et ses dérivés

- **NO et O_2**

En phase aqueuse, le bilan de l'auto-oxydation de NO à pH neutre est le suivant :

$$4\ NO + O_2 + 2\ H_2O \rightarrow 4\ NO_2^- + 4\ H^+$$

- **NO et O_2^-**

Les dérivés de l'O_2 sont générés dans des processus métaboliques normaux et pathologiques par différentes cellules telles que les macrophages et les polynucléaires. Parmi ces composés, O_2^- et H_2O_2 sont les principales espèces réagissant avec NO.

La réaction entre les radicaux NO et O_2^- forme du peroxynitrite ($ONOO^-$) :

$$NO + O_2^- \rightarrow ONOO^-$$

$ONOO^-$ peut également être formé par la réaction de NO_2^- avec H_2O_2 ou de NO^- avec O_2. Cependant ces réactions restent exceptionnelles dans les milieux biologiques.

La voie principale d'élimination de $ONOO^-$ est son réarrangement en nitrates (NO_3^-), et ce d'autant plus rapidement que le milieu est acide.

En outre, la protonation de $ONOO^-$ en milieu aqueux conduit à l'acide peroxynitreux (ONOOH) qui se dissocie pour former les radicaux OH et NO_2 selon la réaction suivante :

$$ONOOH \rightarrow OH + NO_2$$

$ONOO^-$ est un agent oxydant sous sa forme anionique ou sous sa forme protonée activée, et comme un agent nitrosylant du fait de sa décomposition en NO_2. $ONOO^-$ agit notamment sur les macromolécules biologiques, contribuant à des processus délétères (dommages à l'ADN) mais également à la détoxification de O_2^- (Kroncke KD et coll., 2000). Ses principales réactions oxydantes sont la nitration des résidus tyrosine et la peroxydation lipidique (Goldstein S and Merenyi G, 2008).

- **Réaction entre NO et H_2O_2**

H_2O_2 peut réagir directement avec NO. La réaction forme l'oxygène singulet $^1O_2$ détectable par chimiluminescence, et le protoxyde d'azote (N_2O) :

$$2\ NO + H_2O_2 \rightarrow {}^1O_2 + H_2O + N_2O$$

L'O_2 singulet ainsi formé est très réactif et peut participer à la destruction cellulaire et à des processus inflammatoires pendant l'activation des macrophages.

De plus, la réaction entre NO et H_2O_2 peut également conduire à la formation de l'espèce *S*-nitrosylante NO_2 :

$$NO + H_2O_2 \rightarrow H_2O + NO_2$$

II-1-2. Réactions avec les métaux de transition

NO peut se fixer à la plupart des métaux de transition. La réaction aboutit à la formation d'un complexe métal-nitrosyl. Les vitesses de réaction et la stabilité des complexes dépendent de la nature du métal.

La réaction entre NO et le fer est la plus étudiée. L'affinité de NO est beaucoup plus élevée pour l'état ferreux Fe^{2+} que pour l'état ferrique Fe^{3+} (Cammack R et coll., 1998). La réaction entre Fe^{2+} et NO, en solution aqueuse, forme un simple complexe :

$$Fe^{2+} + NO \rightarrow Fe^{2+}NO \quad (k = 1{,}0 \times 10^5\ M^{-1}s^{-1}, \text{ à } 37°C)$$

Lorsque le fer est associé à une protéine telle que l'hème (H), la vitesse de formation et la stabilité du complexe fer-nitrosyl sont augmentées :

$$Fe(II)H + NO \rightarrow Fe(II)HNO \quad (k = 1{,}8 \times 10^9\ M^{-1}s^{-1}, \text{ à } 37°C)$$

Ces constantes de vitesse élevées suggèrent que les protéines héminiques sont des récepteurs majeurs du NO. Ainsi, NO se fixe également rapidement à l'hémoglobine (Hb ; Angelo M et coll., 2008) pour former le complexe stable HbNO avec une affinité 100 fois supérieure à celle de O_2. La demi-vie du complexe en milieu tamponné est alors de 12 min contre quelques millisecondes pour NO ; ce composé représente donc une forme stable de NO qui peut le transporter et le libérer sur d'autres cibles chimiques. Par ailleurs, la fixation de NO sur l'atome de fer du groupement hème de la guanylate cyclase provoque une modification de la structure 3D de l'enzyme, exposant ainsi le site catalytique au GTP, le substrat de l'enzyme, qui peut-être alors être transformé en GMPc (Craven PA and DeRubertis FR, 1978), qui favorise la vasodilatation (Weissmann N et coll., 2000), la biogenèse des mitochondries (Clementi E and Nisoli E, 2005) et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Homer KL and Wanstall JC, 2002).

Par ailleurs, en se fixant sur l'hème de la cytochrome-c oxydase, NO inhibe la chaîne respiratoire mitochondriale.

NO se fixe aussi au Co^{2+}, à Mn^{2+} et à Cu^{2+}. NO peut agir aussi comme réducteur vis-à-vis de certaines métalloprotéines.

II-1-3. Réactions avec les noyaux aromatiques

La nitration des noyaux aromatiques s'effectue par transfert de charges entre NO^+ et le groupe aromatique donneur d'un électron ou par réaction avec $ONOO^-$. Cette réaction de nitration peut affecter un acide aminé libre ou intégré dans une chaîne polypeptidique sous forme de résidu. Ainsi, la tyrosine peut être modifiée en 3-nitrotyrosine qui représente un marqueur de l'inflammation *in vivo*. Des études ont montré une importante corrélation entre l'augmentation plasmatique de 3-nitrotyrosine et le développement de maladies coronariennes chez l'homme : environ 10 fois plus de résidus tyrosine sont nitrosylés dans le plasma de patients souffrants de maladies coronariennes que chez des individus sains (Shishehbor MH et coll., 2003).

NO peut également réagir avec la manganèse superoxide dismutase. La nitration de cette protéine conduit à une inhibition de son activité et ainsi, à une augmentation de la production de O_2^- et $ONOO^-$ responsable d'une augmentation du stress oxydatif dans les mitochondries. La nitration de la MnSOD est notamment impliquée dans les troubles neurologiques.

II-1-4. Réactions avec les thiols

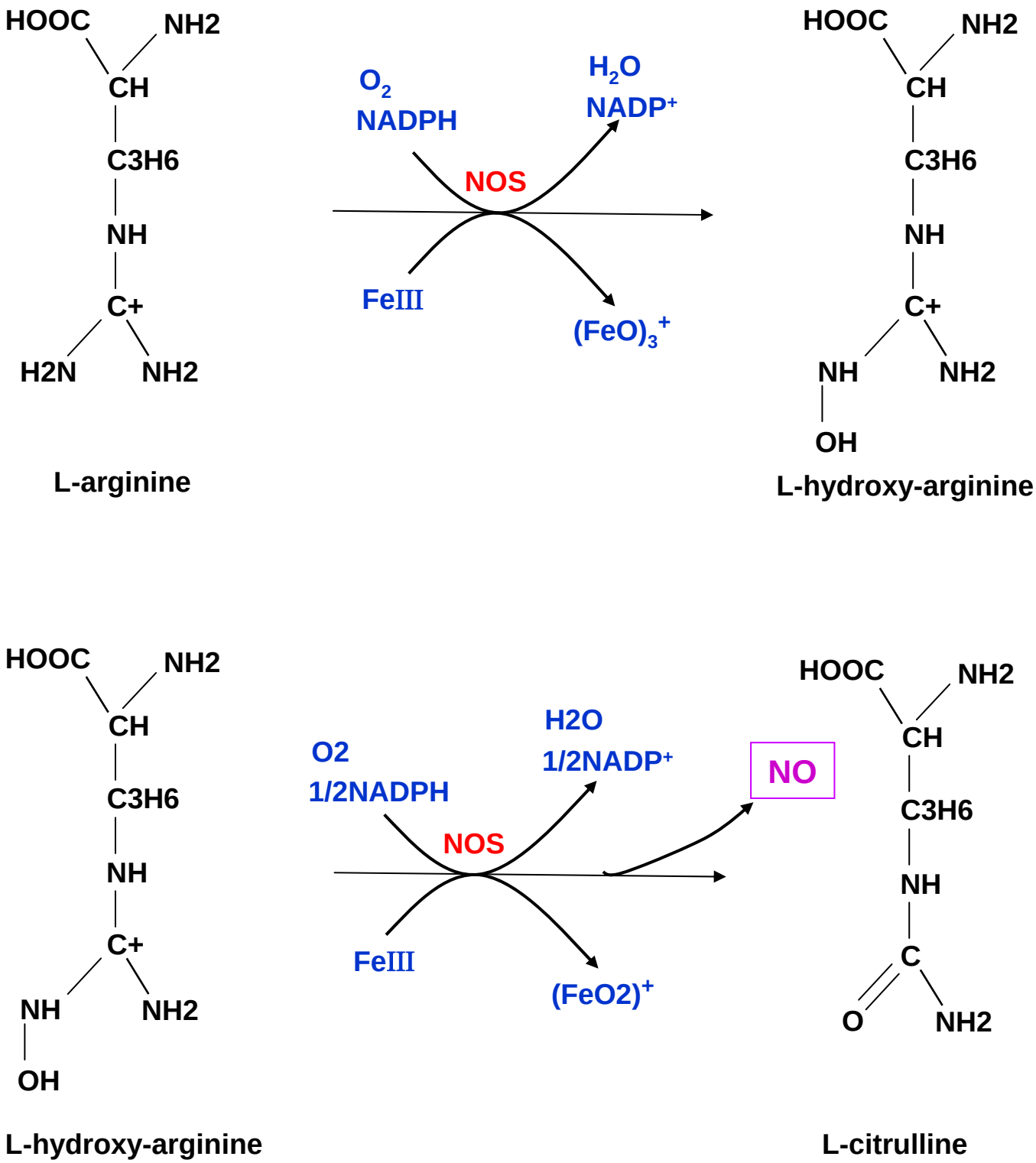
La fixation de NO sur des thiols permet la formation de *S*-nitrosothiols (S-NO) dont la *S*-nitroso-cystéine est un représentant majeur. De plus, chaque sous-unité β de l'Hb contient des résidus thiols très réactifs qui réagissent avec NO pour former la *S*-nitroso-Hb.

A pH 7, en milieu aqueux, la formation des *S*-nitrosothiols n'est observée qu'en milieu oxygéné. *In vitro*, le traitement des thiols en milieu acide (pH = 1,5) avec un agent nitrosylant tel que $NaNO_2$, permet la formation de *S*-nitrosothiols:

$$NaNO_2 + R\text{-}SH \rightarrow R\text{-}SNO$$

L'espèce nitrosylante présentée par les études biochimiques semble être l'anhydride nitreux (N_2O_3 ; Gobert AP et coll., 1999). N_2O_3 réagit rapidement avec des thiols de faible poids moléculaire tels que la cystéine ou le GSH. En revanche, la vitesse de réaction de N_2O_3 avec des protéines telles que l'albumine est plus lente. Ceci peut s'expliquer par l'encombrement stérique des protéines diminuant l'accessibilité aux résidus thiols. Les réactions de formation de *S*-nitrosthiols via N_2O_3 sont les suivantes :

Figure 8: La synthèse enzymatique de NO



Les NOS oxydent l'arginine en citrulline et en NO en consommant du NADPH et de l'O_2. Cette réaction n'est possible qu'en présence des co-facteurs BH_4, FAD, FMN et hème (non montré sur ce schéma).

$$2\ NO + O_2 \rightarrow 2\ NO_2$$

$$NO_2 + NO \rightarrow N_2O_3$$

$$N_2O_3 + R\text{-}SH \rightarrow R\text{-}SNO + H^+ + NO_2^-$$

Chez l'homme, le plasma contient environ 7 µM de *S*-nitrosothiols dont 82% de *S*-nitroso-albumine. Dans le plasma, le NO libre a une demi-vie de quelques secondes à quelques minutes, contre 40 min sous la forme de *S*-nitroso-protéine. Dans un tampon phosphate à pH 7,4, l'albumine nitrosylée a une demi-vie d'environ 24 heures à 25°C et de 12 heures à 37°C. Dans ces mêmes conditions NO et la *S*-nitroso-cystéine ont respectivement une demi-vie de 0,1-1 s et de 15-30 s, suggérant que NO est beaucoup plus stable sous forme nitrosothiols.

Ainsi les protéines possédant des résidus cystéine peuvent fixer NO, le transporter et le libérer à distance des cellules qui le synthétisent ; les composés nitrosylés majeurs présents dans les milieux biologiques sont le *S*-nitroso-glutathion, qui possède de nombreuses fonctions intracellulaires, et la *S*-nitroso-albumine qui assure le transport extracellulaire de NO. Il a été démontré que NO produit par des macrophages activés a un effet cytotoxique sur des parasites extracellulaires du genre *Trypanosoma* uniquement en présence d'albumine ; l'utilisation d'un Ac anti-NO-cystéine inhibe l'effet cytotoxique de macrophages produisant du NO (Mnaimneh S et coll., 1997). La *S*-nitroso-Hb a été identifiée comme transporteur de NO et pouvant réguler les activités vasculaires et pulmonaires (Reynolds JD et coll., 2007).

Enfin, la *S*-nitrosylation de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, enzyme clé de la glycolyse, provoque son inhibition irréversible (Mohr S et coll., 1996).

II-1-5. Réactions avec les centres fer-soufre

NO se lie aux centres fer-soufre des protéines. Des études par résonance paramagnétique électronique ont montré que NO perturbe la configuration spatiale de structures fer-soufre de certaines enzymes ayant pour effet d'inhiber l'activité enzymatique. C'est ainsi que NO interagit avec la protéine 'iron regulatory protein', un régulateur post-transcriptionnel de la ferritine et de la transferrine, contrôlant ainsi les échanges cytosoliques de fer (Soum E and Drapier JC, 2003).

En agissant avec les centres fer-soufre, NO inhibe l'aconitase du cycle de Krebs et l'aconitase de *Burkholderia mallei*, entrainant un effet antimicrobien vis-à-vis de ce pathogène (Jones-Carson J et coll., 2008).

II-2. SYNTHÈSE ENZYMATIQUE DE NO

La synthèse de NO dans les milieux biologiques s'effectue par l'intermédiaire d'une enzyme, la NOS (Fig. 8). Le substrat de la NOS est la L-arginine, les produits de la réaction étant la L-citrulline et NO. Un produit intermédiaire, l'hydroxy-L-arginine est formé et peut servir de substrat à l'enzyme. L'oxydation de la L-arginine au niveau de l'azote terminal de la fonction guanidine conduit donc à la formation de NO. Cette réaction nécessite la présence de O_2 et de cofacteurs tels que la flavine adénine dinucléotide, la flavine mononucléotide, la tétrahydrobioptérine, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

II-2-1. Les différentes isoformes des NOS

Trois NOS ont été clonées chez les mammifères et classées en deux familles distinctes : les NOS dites constitutives (cNOS) et la NOS inductible (iNOS).

Les cNOS sont calcium/calmoduline dépendantes et produisent de faibles quantités de NO, de l'ordre du pmole/min/mg de protéine, sur des périodes brèves. Ces enzymes sont généralement trouvées dans les cellules endothéliales, les neurones, les astrocytes, les plaquettes, les polynucléaires neutrophiles et les glandes surrénales. Cependant, les ARNm de cNOS ont été également trouvés dans les monocytes. Les cNOS sont exprimées de façon constitutive et leur activité est principalement régulée au niveau post-traductionnel par les concentrations en Ca^{2+}. On distingue deux isoformes de cNOS :

- La NOS-1, protéine de 160 kDa, dite NOS neuronale dont le gène est présent sur le chromosome 12 chez l'homme.
- La NOS-3, protéine de 133 kDa, appelée NOS endothéliale dont le gène est présent sur le chromosome 7 chez l'homme.

La iNOS ou NOS-2 est une protéine de 130 kDa codée par un gène présent sur le chromosome 17 chez l'homme. Contrairement aux autres NOS, l'activité de la iNOS est indépendante du complexe calcium/calmoduline et produit de grande quantité de NO, de l'ordre du µmole/min/mg de protéine, pendant de longues périodes. La iNOS est une enzyme régulée au niveau transcriptionnel ; elle est induite principalement par l'intermédiaire de cytokines et de dérivés de micro-organismes. La iNOS peut être induite dans de nombreux types cellulaires tels que les macrophages, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les hépatocytes, ou les astrocytes.

II-2-2. Régulation de l'expression de la iNOS

II-2-2-a. Mécanismes d'induction de la iNOS

Le niveau d'expression de la iNOS dépend du stimulus utilisé, du type de cellule et de l'origine animale des cellules activées. Ainsi, chez les rongeurs, la iNOS des macrophages est principalement activée par les cytokines de type Th1 ou par des composants des bactéries tels que le LPS (Stuehr DJ and Nathan CF, 1989) ou des protéines (Gobert AP et coll., 2002). En revanche, l'expression de la iNOS dans les macrophages humains semble soumise à une régulation beaucoup plus stricte. Les cultures primaires de monocytes humains ou la lignée macrophagique THP-1 ne produisent pas de NO lorsqu'ils sont stimulés *in vitro* par des pathogènes (Cameron ML et coll., 1990), du LPS (Perez-Perez GI et coll., 1995) ou des cytokines de type 1 (Schneemann M et coll., 1993). Il a été cependant décrit que l'expression de la iNOS dans les macrophages humains dépend d'une signalisation impliquant l'activation du CD23, le récepteur des régions Fc des IgE (Vouldoukis I et coll., 1995).

En revanche, les cytokines de type 1 sont des inducteurs bien connus de l'expression de la iNOS dans des lignées de cellules épithéliales intestinales humaines (Kolios G et coll., 1995). De même, des bactéries invasives du genre *Escherichia* ou *Salmonella* induisent l'expression de la iNOS dans les cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2 et DLD-1 (Eaves-Pyles T et coll., 2001).

II-2-2-b. Les voies de signalisation

Les différents inducteurs de l'expression de la iNOS active de nombreuses voies de signalisation. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de la transduction du signal a permis de mettre en évidence les principales voies de signalisation impliquées dans l'expression du gène codant pour la iNOS. L'ensemble de ces travaux établissent que la signalisation conduisant à l'expression de la iNOS est dépendante du type de stimulus, du type de cellule et de l'espèce étudiée.

D'une manière générale, le facteur de transcription NF-κB semble être un élément essentiel pour la transcription du gène de la iNOS (Xie QW et coll., 1993; Ganster RW et coll., 2001). Cinq sites fonctionnels de fixation de NF-κB ont été décrits à partir de la séquence promotrice de la iNOS de la lignée de cellules épithéliales pulmonaires humaines A549 : – 5,2, – 5,5, – 5,8, – 6,1 et – 8,3 kb, les sites à – 5,8 et – 8,3 kb étant les plus importants lors de la stimulation par des cytokines (Marks-Konczalik J et coll., 1998; Taylor BS et coll., 1998).

De plus, il a été décrit que la voie IFN-γ/JAK-2/STAT-1 peut conduire à la transcription de la iNOS chez les rongeurs et chez l'homme (Singh K et coll., 1996; Stempelj M et coll., 2007). La région promotrice du gène codant pour la iNOS chez les mammifères contient des sites de liaison pour STAT-1 (Gao J et coll., 1997). De façon intéressante, Ganster et coll. ont démontré que le promoteur du gène de la iNOS humaine des cellules épithéliales pulmonaires A549 contient deux sites de fixation de STAT-1 qui chevauchent les séquences consensus NF-κB à –5,2 et –5,8 kb ; néanmoins, si le site à –5,8 kb peut fixer STAT-1 et NF-κB, le site à –5,2 kb ne fixe que STAT-1(Ganster RW et coll., 2001).

D'autres facteurs de transcription tels que IRF-1, C/EBP, NF-IL6 ou AP-1 peuvent moduler l'activité de la région promotrice de la iNOS.

II-2-2-c. Régulation post-transcriptionelle de la iNOS

Différentes modifications de la protéine iNOS peuvent par ailleurs moduler la production de NO. Ainsi, la iNOS humaine est active sous forme homodimérique ; la formation du dimère s'effectue indépendamment des co-facteurs NADPH, FAD, FMN et BH_4 (Kolodziejski PJ et coll., 2003). Par ailleurs, il a été décrit plus récemment que la phosphorylation de la Ser^{745} de la iNOS augmente l'activité de la protéine et donc la production de NO dans les cellules endothéliales (Zhang Y et coll., 2007). Cette phosphorylation est réalisée par la kinase ERK1/2 (Zhang Y et coll., 2007).

II-2-2-e. Modulation de la production de NO par la L-arginine

Trois gènes inductibles codent pour des protéines qui appartiennent à une voie métabolique commune dont le substrat de base est l'arginine: la iNOS, l'arginase et l'ornithine décarboxylase (ODC). L'arginase est une enzyme qui synthétise de l'urée et l'ornithine. L'arginase est donc un inhibiteur naturel de la production de NO car elle utilise le même substrat que la iNOS, l'arginine. Il a été décrit que lorsque l'arginase et la iNOS sont exprimées ensemble dans des cellules activées, l'arginine en concentration physiologique (~ 0,2 mM) est principalement métabolisée par l'arginase. Ainsi, bien qu'exprimant la iNOS, ces cellules ne produisent pas de NO (Gobert AP et coll., 2000). Il a été également décrit que l'arginase de *H. pylori* inhibe la production de NO par les macrophages ; un mutant *rocF*, ne possédant pas d'arginase, est incapable d'inhiber la production de NO par les macrophages (Gobert AP et coll., 2001).

De plus, l'ornithine synthétisée par l'arginase est métabolisée par l'ODC pour former des polyamines qui possèdent de nombreuses propriétés physiologiques. De façon importante,

il a été démontré que les polyamines inhibent la traduction des ARNm de la iNOS (Bussiere FI et coll., 2005).

II-3. LES PRINCIPALES FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DE NO

II-3-1. Les principales fonctions métaboliques régulées par NO

II-3-1-a. Le NO et le système cardiovasculaire

En 1980, Furchgott et Zawadski ont observé le rôle indispensable de l'endothélium dans la relaxation des artères isolées soumises à l'action de l'acétylcholine (Furchgott RF and Zawadzki JV, 1980). Ils en ont déduit l'existence d'un facteur fugace responsable de la vasodilatation et secrété par les cellules endothéliales appelé EDRF (pour endothelium derived relaxing factor). C'est en 1987 qu'Ignarro et coll. ont identifié le NO comme le facteur EDRF (Ignarro LJ et coll., 1987). NO diffuse à travers les membranes des cellules endothéliales productrices et pénètre dans les cellules musculaires lisses où il active la guanylate cyclase ; la concentration en GMPc intra-cellulaire de la cellule musculaire lisse augmente et provoque un relâchement des fibres musculaires induisant une vasodilatation. L'ensemble des travaux démontrant le rôle du NO dans le système cardiovasculaire 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 médicales, notamment concernant la lutte contre les pathologies cardiovasculaires et respiratoires. Le NO est ainsi le premier gaz à usage médical. La perte du tonus vasodilatateur NO-dépendant est en effet souvent mise en cause dans ces pathologies. Les indications thérapeutiques les plus courantes sont l'hypertension artérielle, le syndrome de détresse respiratoire aiguë, la bronchopneumonie chronique obstructive, et le syndrome d'hypertension artérielle pulmonaire persistante du nouveau né.

La voie métabolique NO/GMPc joue également un rôle important dans l'érection en initiant et maintenant la pression intracarverneuse du pénis. Le Sildenafil (Viagra) empêche la dégradation du GMPc et favorise donc la vasodilatation. Des études ont montré que la combinaison du Sildenafil avec un donneur de NO augmentait le taux de GMPc chez l'homme (Ballard SA et coll., 1998). Le Sildenafil augmente la durée d'érection chez les souris sauvages et NOS-3$^{-/-}$ mais pas chez les souris NOS-1$^{-/-}$, suggérant que la NOS-1 est nécessaire à l'induction de l'érection par le Sildenafil (Cashen DE et coll., 2002).

Enfin, en 1981, Mellion et coll. ont démontré pour la première fois que le NO et des dérivés nitrogènés augmentent l'activité de la guanylate cyclase et la production de GMPc dans les plaquettes. Le GMPc ainsi produit en grande quantité inhibe l'agrégation des plaquettes mais permet également leur désagrégation (Mellion BT et coll., 1981). Plus tard, il a été démontré que le NO produit par d'autres cellules sanguines, dont les macrophages, est également inhibiteur de l'agrégation plaquettaire (Salvemini D et coll., 1989).

II-3-1-b. Rôle de NO dans le système nerveux central

Les récepteurs NMDA post-synaptiques sont activés par le glutamate et sont alors perméables au sodium, potassium et calcium. Ce dernier va pénétrer dans les cellules, se fixer sur la calmoduline et le complexe formé va activer la NOS-1. NO libéré peut alors agir de façon rétrograde en bloquant les récepteurs NMDA (Manzoni O et coll., 1992).

En neurophysiologie, NO est maintenant considéré comme un messager biologique et/ou un messager rétrograde. Il pourrait avoir un rôle dans la potentialisation à long terme dans l'hippocampe. La potentialisation à long terme est un phénomène qui correspond à une augmentation de l'efficacité de la transmission synaptique favorisant ainsi la mémorisation. Ceci suggère une implication de la production de NO dans certaines formes d'apprentissages dépendant de l'hippocampe. Par le test fonctionnel de mémorisation spatiale, Majlessi et coll. ont montré que des rats recevant un inhibiteur de NOS dans l'hypothalamus ont une capacité d'apprentissage beaucoup moins importante que les rats non traités démontrant ainsi l'implication du NO dans l'apprentissage spatial (Majlessi N et coll., 2008).

Dans les maladies neurodégénératives, telle que la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer, une sur-activation des récepteurs NMDA et de production de NO a été observée et participerait à la pathophysiologie de ces maladies (Lipton SA et coll., 2007).

II-3-1-c. NO et métabolisme gastro-intestinal

Au niveau gastro-intestinal, NO agit dans le plexus mésentérique comme un neurotransmetteur pour réguler la relaxation des fibres musculaires lisses de l'intestin, nécessaire au péristaltisme. Des travaux ont montré que NO, via la production de GMPc, entrainait l'ouverture des canaux Na^+/K^+ conduisant à la relaxation des muscles lisses au niveau du côlon chez le lapin (Benabdallah H et coll., 2008).

NO est également impliqué dans la régulation de la sécrétion du mucus gastrique et dans le maintien du débit sanguin mucosal. En conditions physiologiques, NO est un médiateur endogène modulant l'intégrité des tissus et possédant des propriétés gastroprotectrices.

L'utilisation d'un donneur de NO à des rats permet d'inhiber les lésions gastriques induites par l'administration d'éthanol (Konturek PC et coll., 1998). Cependant, à forte concentration, le NO est impliqué dans de nombreuses pathologies telles que des ulcères gastriques, des gastrites chroniques et des cancers gastro-intestinaux (Sawa T and Ohshima H, 2006).

II-3-2. NO, notre meilleur ennemi

Du diabète à l'hypertension, du cancer au choc septique, de l'asthme à la polyarthrite rhumatoïde, il n'existe probablement pas de pathologie dans laquelle NO ne joue pas un rôle. Malgré de très nombreux effets bénéfiques dans le contrôle des grandes fonctions physiologiques ou dans la lutte contre des pathologies, une production inadaptée de NO peut avoir des conséquences délétères pour les organismes en favorisant les processus pro-inflammatoires ou la mort cellulaire. Quelques exemples cités ci-dessous soulignent ces effets paradoxaux du NO :

NO est un puissant agent anti-prolifératif dont l'activité s'exprime sur les cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* (Hibbs JB, Jr., 2002; Wei D et coll., 2003). Cependant, NO favorise : i) l'apparition de cancer en induisant directement des mutations ponctuelles ou des dommages à l'ADN, en formant de puissants dérivés carcinogènes (nitrosamines) ou en modifiant la conformation des protéines interagissant avec l'ADN (protéines en doigt de zinc), et ii) la progression des tumeurs en stimulant l'angiogenèse (Maeda H and Akaike T, 1998). La participation précise du NO *in vivo* dans les mécanismes de cancérogenèse reste cependant encore à déterminer. En effet, des études récentes ont démontré, par l'utilisation de souris déficientes pour la iNOS, que le NO favorise l'inhibition du développement de tumeurs pulmonaires (Wei D et coll., 2003) mais peut induire également la formation de tumeurs mammaires (Ellies LG et coll., 2003).

L'apoptose est un autre évènement cellulaire modulé par le NO endogène ou exogène. Après les premières descriptions de l'effet pro-apoptotique du NO sur les macrophages (Albina JE et coll., 1993), cette activité a été décrite dans de nombreuses cellules aussi diverses que les neurones ou les cellules endothéliales. L'activation de la mort programmée des cellules par le NO peut s'expliquer entre autre par *i*) la stimulation de l'expression et de l'accumulation dans le noyau du suppresseur de tumeur p53 (Messmer UK et coll., 1994) par une signalisation impliquant p38 kinase (Kim SJ et coll., 2002), ou *ii*) l'inhibition de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Brockhaus F and Brune B, 1998) qui agit en empêchant la libération de cytochrome c des mitochondries en se fixant sur les protéines Bax. Néanmoins, il a été rapporté que le NO possède une activité anti-apoptotique en inhibant

par *S*-nitrosylation les protéines responsables de l'apoptose telles que la caspase 1 (Dimmeler S et coll., 1997), la caspase 3 (Melino G et coll., 1997) ou la caspase 8 (Li J et coll., 1997), ou en supprimant la formation de céramides qui sont nécessaires à l'activation de la caspase 8 (De Nadai C et coll., 2000). Il est par ailleurs intéressant de noter que la protéine Fas induit l'apoptose des lymphocytes en dénitrosylant et donc en activant la caspase 3 (Mannick JB et coll., 1999). Ainsi, le type de cellules, la quantité de NO, le temps d'exposition au NO ou à ses différents dérivés est une liste non exhaustive des paramètres modulant l'apoptose induite par le NO et les évènements physiologiques qui en dépendent.

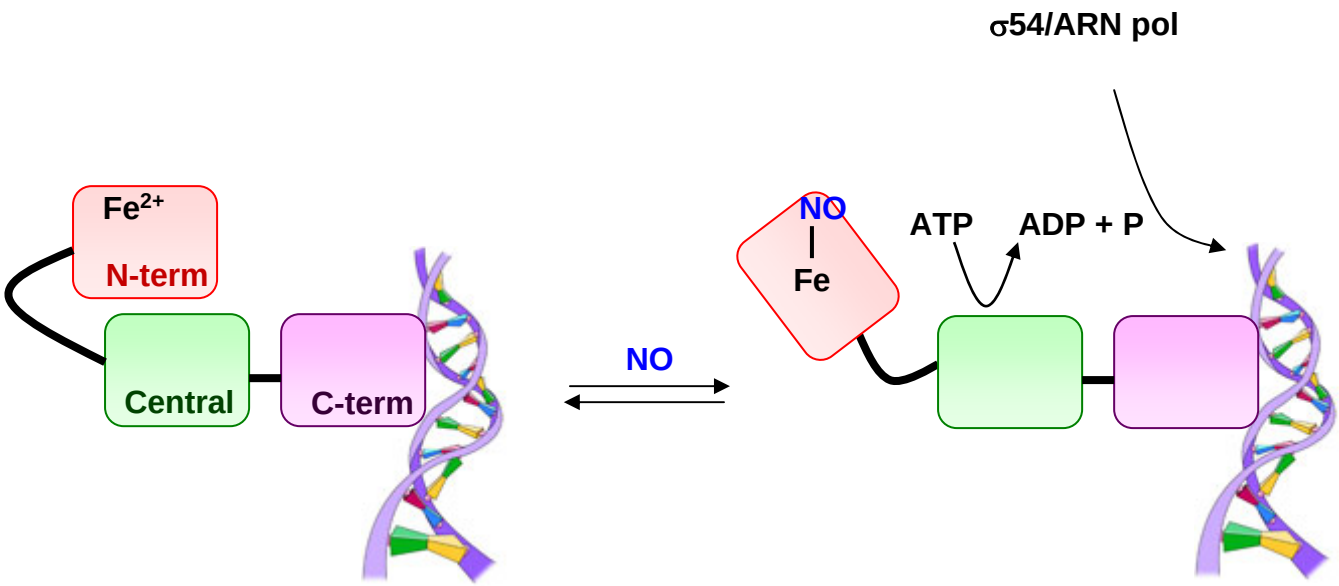
De même, bien que NO soit un facteur de lutte important contre des virus (Karupiah G et coll., 1993), des bactéries (Gobert AP et coll., 2001) ou des parasites (Gobert AP et coll., 2000), il participe à l'immunosuppression observée lors de certaines infections et il est responsable des troubles associés au choc septique (hypotension, hépatotoxicité, dysfonction cardiaque, …) induit par les endotoxines bactériennes. Cet effet paradoxal du NO a été particulièrement mis en évidence par la création de souris déficientes pour la iNOS ; ces souris deviennent à la fois susceptibles à un protozoaire parasite du genre *Leishmania*, mais également résistantes au choc septique induit par le LPS (Wei XQ et coll., 1995). De même, il a été décrit que la production élevée de NO lors d'une infection expérimentale de souris par *Chlamydia psittaci* est bénéfique pour l'hôte lorsque la dose infectieuse est élevée, mais que le NO devient délétère lors d'une infection modérée et plus chronique (Huang J et coll., 2002).

En conclusion, la synthèse de NO au bon moment, à une bonne concentration et au bon endroit est bénéfique pour les organismes producteurs. En revanche, la production anarchique de NO est généralement associée à de sévères immunopathologies.

II-4. RÉPONSE DES *E. coli* AU NO

L'activité immunologique du NO est, en partie, due à son activité anti-proliférative/cytotoxique sur des agents pathogènes. Néanmoins, il est reconnu que NO n'affecte pas la survie des bactéries du genre *Escherichia* (Brunelli L et coll., 1995) ni *C. rodentium* (Vallance BA et coll., 2002). Seules des concentrations non physiologiques, de l'ordre du millimolaire, peuvent affecter la croissance de ces bactéries. Cette insensibilité au NO peut s'expliquer par l'acquisition de mécanismes de détection et de résistance au NO.

Figure 9: L'activation de la transcription par NO via NorR



NorR est une protéine à 3 domaines. La région N-terminale contient un ion fer non-héminique qui fixe NO; le domaine central contenant une ATPase est alors accessible permettant l'hydrolyse de l'ATP et l'activation de la transcription. D'après d'Autréaux et coll., 2005.

II-4-1. Les senseurs de NO

Certaines bactéries dont *E. coli* expriment des senseurs de NO, qui fixent le NO et agissent comme des régulateurs transcriptionnels. Les senseurs de NO les plus connus chez *E. coli* sont NorR (pour NO-responsive regulator) et NsrR (pour NO_2^--responsive repressor).

II-4-1-a. NorR

NorR est un senseur de NO dépendant de σ^{54}. C'est un régulateur positif appartenant à la famille des 'enhancer binding protein'. NorR contient trois domaines : *i*) un domaine C-terminal de liaison à l'ADN sur des séquences GT-$(N)_7$-AC, *ii*) un domaine central possédant une activité ATPase et permettant l'interaction avec σ^{54} et *iii*) une région N-terminale permettant la détection du NO. NorR possède une molécule de Fe^{2+} par monomère sur un résidu aspartate en position 99 ; c'est sur ce fer que se fixe NO (D'Autreaux B et coll., 2005).

En absence de NO, NorR est sous forme inactive ; il est lié à l'ADN sous forme de trimère (Justino MC et coll., 2005) mais les domaines N-terminal et central sont associés en un complexe protéique. Lorsque NorR fixe le NO, une modification structurelle du domaine N-terminal va libérer le site ATPasique, permettant l'interaction avec le complexe σ^{54}-ARN polymérase et la transcription des gènes (Fig. 9).

Une analyse comparative du transcriptome de *E. coli* MG1655 et de *E. coli* MG1655 Δ*norR*, cultivés en anaérobie en présence de NO (10 µM pendant 5 min) a montré que seul l'opéron *norVW* qui code pour une flavorubrédoxine (cf. II-4-2.) est régulé positivement par NorR (Pullan ST et coll., 2007). De façon surprenante, NorR semble également régulé négativement la transcription de la cytochrome *c* NO_2^- réductase, NrfA (Pullan ST et coll., 2007). Néanmoins, d'autres études devraient être réalisées pour identifier d'autres gènes régulés par NorR dans d'autres conditions (aérobie, autres concentrations et donneurs de NO).

II-4-1-b. NsrR

Le gène *nsrR* a été identifié chez *Nitrosomonas europaea* (Beaumont HJ et coll., 2004). En présence de NO_2^- ou lors de la délétion du gène *nsrR*, le gène *nirK*, qui code pour une NO_2^- réductase, est exprimé, suggérant que NsrR régule négativement l'expression du gène *nirK* et que cette répression est levée en présence de NO_2^- (Beaumont HJ et coll., 2004). Le gène *yjeB* chez *E. coli* a été par la suite identifié par Bodenmiller et Spiro comme homologue à *nsrR* de *N. europaea* (Bodenmiller DM and Spiro S, 2006) ; on utilise donc désormais la terminologie NsrR pour ce senseur.

Tableau 3: Gènes régulés par NsrR

Liste des gènes réprimés par NsrR

Gènes	Produits	Opérons
hcr	NADH oxydoréductase	*hcp-hcr*
hcp	NADH oxydoréductase	
yccM	*Protéine membranaire à [4Fe-4S]*	
uspF	Protéine de liaison à l'ADN	
yeaR	Inconnu	
ccmG	Cytochrome *c*	*napFDAGHBC-*
ccmF	Cytochrome *c*	*ccmABCDEFGH*
napB	NO_3^- réductase	
napH	NO_3^- réductase	
napD	NO_3^- réductase	
napF	NO_3^- réductase	
hmpA	Flavohémoglobine	
ygbA	Inconnu	
nrfA	NO_2^- réductase	*nrfABCDEFGH*
nrfB	NO_2^- réductase	
nrfC	NO_2^- réductase	
nrfD	NO_2^- réductase	
nrfE	NO_2^- réductase	
nrfF	NO_2^- réductase	
ytfE	Inconnu	

Liste des gènes activés par NsrR

Gènes	Produits	Opérons
insB1	Protéine InsB	
insB2	Protéine InsB	
insB3	Protéine InsB	
insB4	Protéine InsB	
insB5	Protéine InsB	
insB6	Protéine InsB	
ykfJ	Inconnu	
mmuP	Transporteur ABC	
yafE	*Méthyl transférase*	
yagA	Cytochrome *c*	
dadA	Déhydrogénase	
ykgF	*Déhydrogénase*	
betB	Bétaïne aldéhyde déhydrogénase	
cyoE	Cytochrome *bo* oxydase	*cyoABCDE*
cyoC	Cytochrome *bo* oxydase	
cyoB	Cytochrome *bo* oxydase	
cyoA	Cytochrome *bo* oxydase	
ompF	Porine membranaire	
ydbC	*Oxydoréductase*	
ygeF	Inconnu	
yiiL	Rhamnose mutarotase	
yjbB	*Protéine en hélice* α	
yjiV	Inconnu	

D'après Filenko et coll., 2007.

NsrR d'*E. coli* se fixe à l'ADN sur une séquence 'AAGATGNATTTNAAATNCATCTT' située en général en position –10 dans les séquences promotrices de certains gènes. La liaison à l'ADN s'effectue par un motif 'helix-turn-helix' en région N-terminale. Le NO se fixerait sur des centres fer-soufre en position 91, 96 et/ou 102 correspondant à des résidus cystéine, supprimant la liaison à l'ADN et permettant ainsi la dé-répression des promoteurs et la transcription des gènes.

Afin d'éviter un effet polaire de la mutation *nsrR* sur *vacB* qui code pour une RNase R, Filenko et coll. ont développé l'approche suivante pour analyser l'ensemble des gènes régulés par NsrR chez *E. coli* MG1655 : une souche de *E. coli* a été transformée avec un plasmide exprimant en multicopie la région promotrice du gène *ytfE* qui contient la séquence consensus de NsrR. Ainsi, dans cette souche, les auteurs ont pu favoriser la fixation de NsrR sur le gène plasmidique et supprimer la fixation de NsrR sur l'ADN génomique, obtenant un phénotype identique à celui d'une mutation *nsrR*. En comparant le transcriptome de cette souche avec celui d'une bactérie transformée avec un plasmide exprimant la séquence consensus mutée, les auteurs ont pu déterminer les gènes régulés par NsrR. Les résultats montrent que NsrR réprime 20 gènes correspondant à 9 opérons (Tableau 3 ; Filenko N et coll., 2007). Parmi ces gènes, on retrouve ceux pour lesquels l'analyse bio-informatique a permis d'identifier la séquence consensus de NsrR dans la région promotrice : *ytfE*, *hmpA* et *ygbA* (Bodenmiller DM and Spiro S, 2006); notons cependant que le gène *tehA* dont la région promotrice possède la séquence de fixation de NsrR (Bodenmiller DM and Spiro S, 2006) n'a pas été mis en évidence lors de cette étude (Filenko N et coll., 2007). Par ailleurs, NsrR active 24 gènes (Tableau 3 ; Filenko N et coll., 2007).

II-4-1-c. Autres senseurs de NO

- **SoxRS**

Le premier régulateur transcriptionnel répondant au NO mis en évidence a été SoxR. Ce dernier contient un cluster [2Fe–2S] qui peut être oxydé par O_2^- et par NO. SoxR activé permet la transcription du gène *soxS* dont le produit SoxS induit à son tour l'expression des gènes du régulon SoxRS (Hidalgo E and Demple B, 1994). Ces gènes permettent la résistance des bactéries au stress oxydatif. SoxRS ne jouerait cependant qu'un rôle mineur dans la réponse physiologique de *E. coli* au NO (Justino MC et coll., 2005).

- **Fur**

Fur contrôle la concentration en fer dans les bactéries Gram négatif. La protéine se fixe au niveau de la région promotrice des gènes impliqués dans le métabolisme du fer, réprimant ainsi leur expression. La fixation de Fur à l'ADN est inhibée par NO qui réagit avec le fer pour former un fer-nitrosyl. NO permet donc la transcription des gènes réprimés par Fur (D'Autreaux B et coll., 2002).

- **OxyR**

OxyR est un activateur transcriptionnel appartenant à la famille des protéines LysR. On le retrouve le plus souvent sous forme de dimère ou de tétramère. Chaque monomère contient un groupement thiol qui va fixer le NO entrainant des modifications structurales permettant la fixation d'OxyR sur l'ADN. OxyR induit la transcription de nombreux gènes impliqués dans la protection contre le stress oxydatif comme *oxyS* qui est impliqué dans la réparation de l'ADN (Kim SO et coll., 2002).

- **FNR**

FNR est un répresseur transcriptionnel qui contient un cluster [4Fe-4S] qui réagirait avec NO (Crack J et coll., 2004). FNR régule l'expression de gènes impliqués dans la respiration anaérobie et le métabolisme du carbone. La flavohémoglobine Hmp est réprimée par FNR ; en présence de NO, FNR change de conformation, entrainant une dé-répression du gène. Cependant, la mise en évidence récente de NsrR et de son activité sur l'expression de *hmp* pourrait minimiser le rôle de FNR.

II-4-2. Les systèmes de détoxification du NO

Chez *E. coli*, il existe trois systèmes enzymatiques principaux de détoxification du NO : la flavohémoglobine, la flavorubrédoxine et les NO_3^-/NO_2^- réductases. Ces enzymes utilisent le NO ou ses dérivés comme substrat et permettent à la bactérie de résister à leurs effets toxiques.

- **La flavohémoglobine**

La flavohémoglobine (Hmp) possède une activité NO dioxygénase chez *E. coli* et *Salmonella*. L'expression de *hmpA* est induite par différentes sources de NO, incluant NO_2^-, NO_3^- et GSNO. Chez *E. coli*, les deux principaux régulateurs de HmpA en aérobie et anaérobie sont NsrR et FNR. En aérobie, la consommation de NO par Hmp génère NO_3^-. Par contre en anaérobie, Hmp permet la réduction du NO en oxyde nitreux N_2O. Des travaux réalisés chez

Salmonella ont montré l'importance de HmpA dans la survie intra-macrophagique (McCollister BD et coll., 2005) et dans la virulence (Bang IS et coll., 2006). De même, une mutation dans le gène *hmp* diminue la virulence de *Yersinia pestis* (dose létale 10 fois plus faible ; (Sebbane F et coll., 2006).

- **La flavorubrédoxine**

La flavorubrédoxine NorV est une réductase qui contribue à la détoxification du NO en conditions anaérobiques. Elle est associée à une oxidoréductase NorW et permet ainsi de réduire le NO en N_2O ou en NO^-. Un mutant *norV* chez *E. coli* ne se multiplie pas en présence d'une centaine de micromolaires de NO (Hutchings MI et coll., 2002), mais la délétion de *norV* ne modifie pas la capacité de *E. coli* à survivre dans les macrophages (Pullan ST et coll., 2007).

- **NO_3^-/NO_2^- réductases**

On distingue la cytochrome c NO_2^- réductase Nrf qui est périplasmique de la NO_2^- réductase Nir qui est cytoplasmique. De même, les NO_3^- réductases Nap et Nar sont respectivement périplasmique et cytoplasmique. Ces enzymes permettent la réduction de NO_3^- en NO_2^-, puis de NO_2^- en NO ; la protéine Nrf convertit directement NO_2^-en ammonium. De façon très intéressante, il a été récemment suggéré que la protéine Nar, et non pas Nir ni Nrf, produit du NO lorsque *S. enterica* se trouve en présence de NO_3^- ; ce NO endogène, généré par la bactérie, active NsrR et NorR et permet l'expression des gènes de résistance *hmp* et *norV* (Gilberthorpe NJ and Poole RK, 2008).

Pour résumé, l'effet bactériotoxique du NO n'est pas observé sur *E. coli*. Cette bactérie à acquit de nombreux mécanismes pour résister au stress nitrosant. Néanmoins, l'effet du NO sur des *E. coli* pathogènes n'a pas été encore été étudié à ce jour.

III. LES *E. coli* PRODUCTEURS DE SHIGA-TOXINE

III-1. LES *E. coli* PATHOGÈNES INTESTINAUX

E. coli est un bacille à Gram négatif de la famille des Entérobactéries. C'est une bactérie commensale de la flore intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud. Elle représente

Tableau 4: Les séropathotypes des STEC

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

Classification des STEC en fonction de la fréquence d'isolement lors d'épidémies et de la sévérité de la pathologie engendrée. D'après Karmali et coll., 2003.

moins de 1% du microbiote intestinal total mais 80% du microbiote aérobie. Cependant, il existe des souches d'*E. coli* responsables d'infections intestinales qui sont classées en sept pathovars en fonction des signes cliniques et du mode d'interaction avec les cellules intestinales (Darfeuille-Michaud A et coll., 1998; Nataro JP and Kaper JB, 1998) : *E. coli* entérotoxigèniques, *E. coli* entéroinvasifs, *E. coli* entéroagrégatifs, *E. coli* à adhésion diffuse, *E. coli* d'attachement et d'invasion, *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et *E. coli* entérohémorragiques (EHEC).

Les EHEC provoquent des colites hémorragiques qui peuvent se compliquer par un syndrome hémolytique et urémique (SHU) qui touche essentiellement les enfants ou par un purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) chez les personnes âgées. Ces troubles cliniques sont principalement dus à la production d'une toxine, la Shiga-toxine (Stx). Le pathovar EHEC appartient donc à 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.

III-2. CLASSIFICATION DES STEC

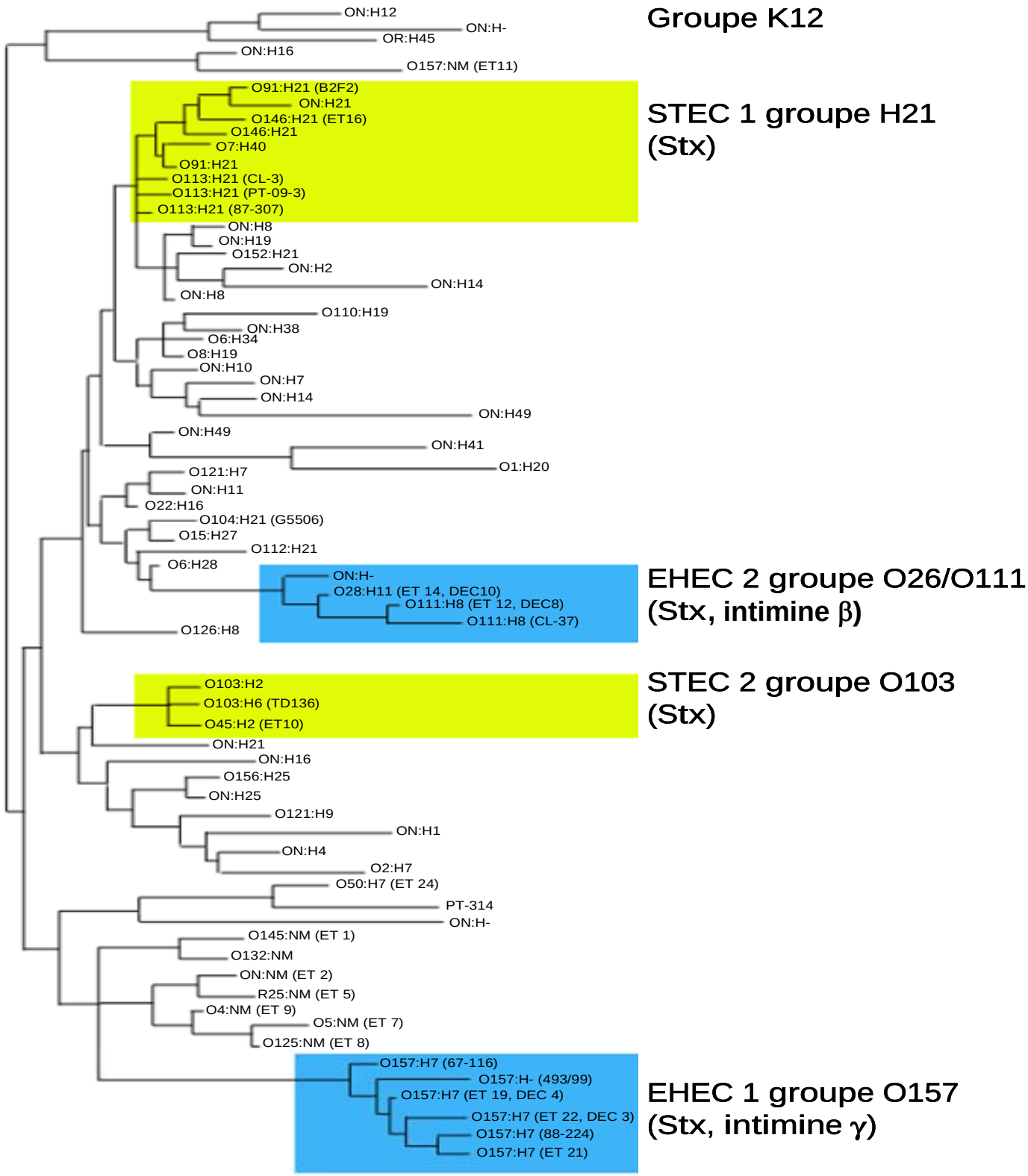
III-2-1. Classification antigénique des STEC

Les STEC sont caractérisés par la combinaison sérotypique O:H:K de leurs antigènes du LPS (O), flagellaires (H) et capsulaires (K). L'association O:H est néanmoins couramment utilisée pour classifier les STEC. Ces bactéries sont réparties dans plus d'une centaine de sérotypes (Johnson KE et coll., 2006). Le sérotype le plus fréquemment isolé de cas cliniques est le sérotype O157:H7. Il est en particulier à l'origine de la grande majorité des épidémies survenues au Japon, aux Etats-Unis et en Europe.

III-2-2. Les séropathotypes des STEC

La classification en séropathotypes est très couramment utilisée. Cette classification est basée sur l'incidence des STEC et leur association avec le SHU (Tableau 4). Les STEC ont été classés en 5 séropathotypes de A à E (Karmali MA et coll., 2003). Les séropathotypes A et B incluent les souches dont les sérotypes sont associés aux épidémies de SHU, le séropathotype A regroupant les souches de sérotype O157:H7. Le séropathotype C inclut les STEC associés à des cas sporadiques de SHU. Le séropathotype D comprend les souches ayant une faible incidence sur l'homme et aucune association avec un SHU, et les souches contenues dans le séropathotype E n'ont pas été retrouvées chez l'homme.

Figure 10: Diversité clonale des STEC



Arbre phylogénétique obtenu par la méthode du plus proche voisin. Les boites colorées représentent les 4 groupes de STEC dans lesquels sont présents les clones les plus répandus. D'après Whittam et coll., 1998.

III-2-2. Classement phylogénétique

Une autre classification des STEC consiste à les regrouper en fonction de leur fond génétique. Quatre groupes phylogénétiques ont été identifiés (A, B1, B2, D, E). Il est important de noter que les identifiants (A à E) de ce classement ne correspondent pas à ceux du séropathotype. Les souches de STEC/EHEC sont présentes dans les groupes phylogénétiques A et B1. De plus, les souches de sérotype O157:H7 ont été regroupées dans le groupe E (Escobar-Paramo P et coll., 2004). Les souches les plus pathogènes, celles des séropathotypes A et B, appartiennent respectivement aux groupes phylogénétiques E et B1.

Pour étudier l'évolution des souches de STEC, de nombreux auteurs ont étudié le groupe clonal de chaque souche, qui est basé sur un alignement des séquences primaires de plusieurs enzymes. Ces travaux ont permis de proposer l'existence de quatre lignées évolutives indépendantes chez les EHEC ; ces groupes clonaux ont été appelés EHEC-1, EHEC 2, STEC-1 et STEC-2 (Fig. 10). Cependant, certains travaux suggèrent que les EHEC-1 et EHEC-2 correspondent à deux clones d'EPEC ayant acquis les gènes *stx* (Wieler LH et coll., 1997).

III-3. ÉPIDÉMIOLOGIE DES INFECTIONS À EHEC

III-3-1. Réservoirs et vecteurs

Les STEC sont transmis à l'homme par ingestion d'aliments souillés. La diversité des aliments incriminés dans cette transmission est importante (viande, lait, légumes, eau de boisson), mais le principal réservoir de ces bactéries est le tube digestif des bovins, en particulier le rumen et le côlon. Cependant ces bactéries ont été retrouvées chez d'autres ruminants tels que les ovins, les porcins et d'autres animaux sauvages ou domestiques. Les STEC paraissent omniprésents dans la population bovine : selon les études et le mode de détection, jusqu'à 70% des animaux d'élevage peuvent être porteur de STEC (Montenegro MA et coll., 1990; Blanco M et coll., 1996). Cette prévalence varierait en fonction du mode d'élevage des animaux ; ainsi, les animaux porteurs des STEC sont environ deux fois plus importants dans les élevages intensifs que chez les animaux sauvages (Hussein HS et coll., 2007). Plusieurs études ont montré que le portage suit un rythme saisonnier, les mois les plus chauds correspondant à une augmentation du nombre d'animaux infectés (Jenkins C et coll., 2002).

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

excrétées varie de 10^2 à 10^5 bactéries/g de fèces (Zhao T et coll., 1995) et plusieurs études laissent supposer que le changement de régime alimentaire serait responsable de l'excrétion intermittente des bactéries (Harmon BG et coll., 1999). Cette excrétion importante des STEC est considérée comme un facteur de risque élevé pour l'infection des humains par ces agents pathogènes.

III-3-2. Sources d'infection

Les STEC entrent le plus souvent dans la chaîne alimentaire lors de l'abattage des animaux. Si ce dernier est correctement réalisé, il est peu probable que les carcasses se trouvent au contact du contenu intestinal contenant les STEC lors de la découpe. En revanche, il est assez difficile d'éliminer sûrement l'autre source importante de contamination : la peau. En effet, il a été montré que les cuirs des bovins étaient fréquemment porteurs de souches STEC (Elder RO et coll., 2000). Lors de la découpe des carcasses, les bactéries peuvent être ainsi transmises de la peau à la viande par les ouvriers, soit par les mains ayant touché la peau soit par les outils. Les aliments les plus fréquemment impliqués sont la viande de bœuf (essentiellement les steaks hachés) mais aussi les saucisses, le lait et ses produits dérivés, dont notamment les fromages au lait cru.

Les fruits et les salades ont également été mis en cause ; leur contamination est le plus souvent due à un contact avec du fumier (Soderstrom A et coll., 2005). Entre 1982 et 2002 aux Etats-Unis, les fruits et légumes ont été à l'origine de 34% des toxi-infections alimentaires dues aux STEC (Rangel JM et coll., 2005). En 2006, aux Etats-Unis des lots d'épinards frais ont été à l'origine d'une des plus grandes épidémies rencontrées dans ce pays (Maki DG et coll., 2006).

Des cas de contamination par l'eau de boisson ou de baignade ont été rapportés. En 2002, les contaminations par l'eau représentaient 9 % des épidémies survenues aux Etats-Unis entre 1982 et 2002 (Rangel JM et coll., 2005). D'autre part, des études menées par Muniesa et coll. ont mis en évidence des particules virales libres codant les toxines Stx dans les eaux de rivières et en station d'épuration. Ces particules constituent donc un réservoir naturel de gènes *stx* capables d'être acquis par d'autres bactéries par transduction (Muniesa M and Jofre J, 1998).

La contamination interhumaine est également possible et intervient en particulier dans les crèches et les écoles ainsi que parmi le personnel soignant des hôpitaux lors d'épidémies.

III-3-3. Epidémiologie des infections humaines

III-3-3-a. Les épidémies

- **Les Etats-Unis**

Les Etats-Unis sont les plus touchés par les épidémies d'infection par les EHEC. Le nombre de cas d'infection à EHEC est d'environ 73000 par an.

L'une des épidémies les plus importantes a touché 732 personnes dans l'état de Washington en 1993, dont 55 ont développé un SHU et 4 sont décédées (Bell BP et coll., 1994); l'âge moyen des malades était de 7 ans. L'aliment incriminé était de la viande de bœuf hachée. Une deuxième épidémie massive attribuée à la consommation d'eau contaminée a touché 781 personnes, avec 14 cas de SHU et 2 décès, en 1999. En 2006, 2 épidémies ont été recensées aux USA : la première due à la consommation d'épinards frais contaminés a touché 204 personnes dans 25 états différents ; 32 personnes développèrent un SHU et il y eut 3 morts (Maki DG, 2006). La seconde a touché 71 personnes dans 5 états différents ; cette épidémie a été liée à la consommation de steaks hachés contaminés dans les restaurants d'une chaine de restauration rapide.

- **L'Asie**

De nombreux pays asiatiques industrialisés ont aussi été gravement touchés par les infections à EHEC. Parmi eux on peut citer le Japon qui a connu la plus grande épidémie jamais répertoriée en 1996. Près de 1000 personnes ont été contaminées, 101 ont développé un SHU et 8 sont décédées (Michino H et coll., 1999). Cette épidémie est survenue dans les cantines scolaires à la suite de la consommation de pousses de radis crus contaminées ; l'infection s'est également propagée aux membres d'encadrement et aux familles des enfants atteints.

- **L'Australie**

L'Australie connaît de nombreuses épidémies chaque année. Ces dernières n'excèdent que très rarement la dizaine de patients et elles ne sont en général pas dues aux EHEC de sérotype O157:H7 mais aux EHEC appartenant à des sérogroupes tels que O113 ou O111.

- **L'Europe**

L'Europe connaît régulièrement des cas d'infection par les EHEC. La plus grande épidémie survenue en Europe date de novembre 1996 en Ecosse. Elle a touché 501 personnes dont 20 sont décédées. La cause de l'infection fut la consommation de viande froide contaminée par *E. coli* O157:H7 (Ahmed SaMD et coll., 1998).

➢ **La France**

Deux épidémies majeures ont eu lieu en France en 2005. Elles ont touché 69 et 17 personnes et ont provoqué chacune 17 cas de SHU chez de jeunes enfants. La première était due à la consommation de steak hachés de bœuf surgelés contaminés par des *E. coli* O157:H7 et la seconde était due à la consommation de camemberts au lait cru contaminés par des *E. coli* O26:H11 (http://www.invs.sante.fr/surveillance/shu/shu_2005.pdf). Par ailleurs, une contamination massive de 1,5 tonne de steaks hachés par *E. coli* O157:H7 a été observée cette année, mais aucun cas de pathologie humaine n'a été détecté.

III-3-3-b. Les cas sporadiques

Alors que les grandes épidémies sont souvent bien documentées, la fréquence des cas sporadiques d'infection est probablement sous-estimée. En effet, les STEC ne sont pas recherchés systématiquement chez les patients atteints de diarrhées et à l'heure actuelle il n'existe pas de test rapide permettant la détection de souches de sérotype non-O157:H7 du fait de leur grande diversité biochimique. Les formes sporadiques d'infection représenteraient pourtant la majorité des cas.

Pour la période 2000-2004, la plupart des 2600 cas d'infection par les EHEC dans les 17 pays du réseau Enter-net (www.hpa.org.uk/hpa/inter/enter-net_menu.htm), dont la moitié est due à *E coli* O157:H7, sont des cas sporadiques.

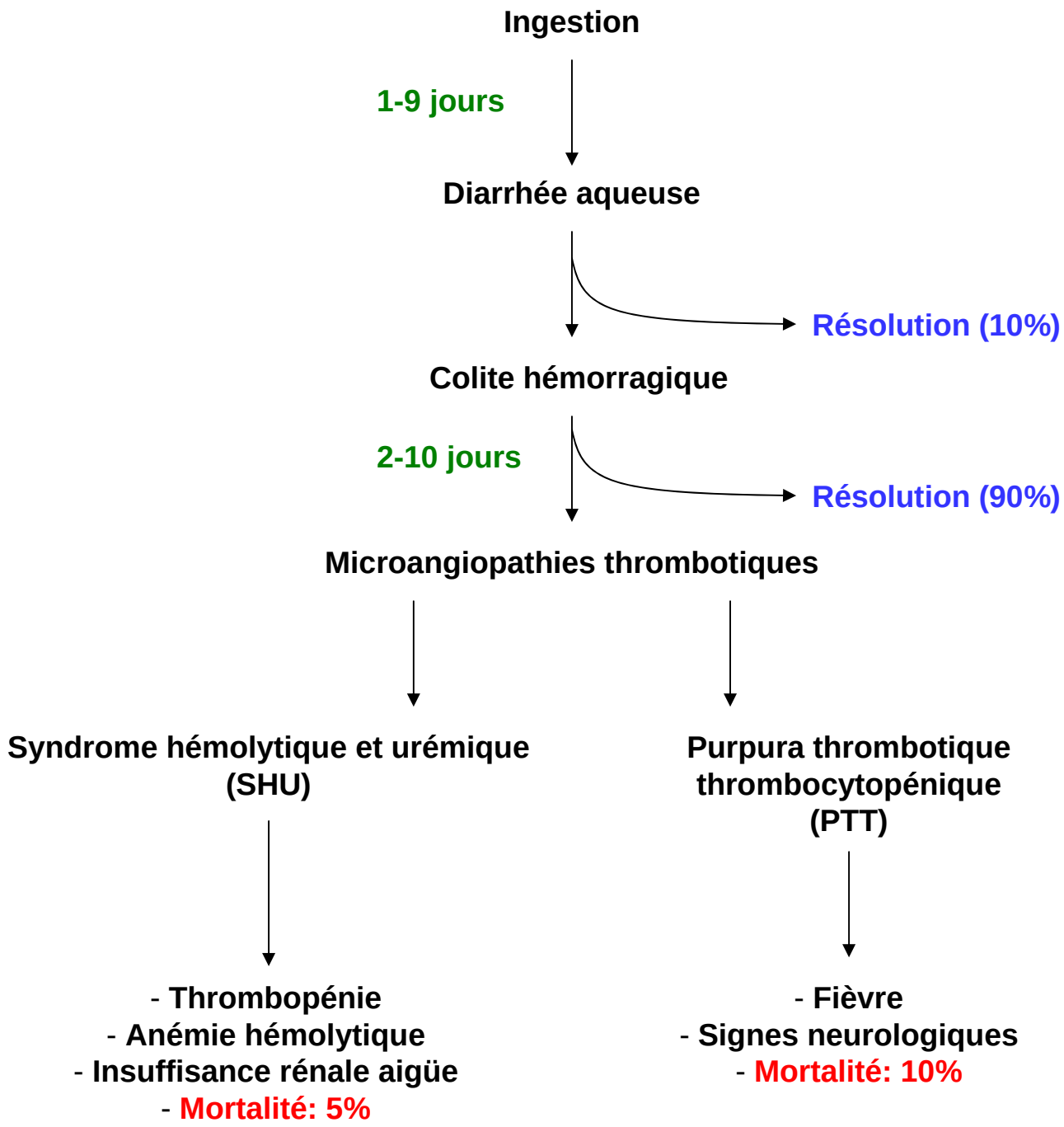
En France, aucune donnée sur l'incidence des infections à STEC n'est disponible et par conséquent le seul outil disponible est la surveillance du SHU typique chez l'enfant par les pédiatres néphrologues. En 2006, le réseau de surveillance des cas de SHU a recensé 104 cas chez les enfants de moins de 15 ans. Le taux d'incidence moyen des SHU dus à des EHEC en France est de 0,71 cas pour 10^5 enfants de moins de 15 ans, 1,87 cas pour 10^5 enfants de moins de 5 ans et de 2,3 cas pour 10^5 enfants de 1 à 3 ans (http://www.invs.sante.fr/surveillance/shu/shu_2005.pdf). Dans 83% des cas, le SHU est du à une souche d'EHEC de sérotype O157:H7. Néanmoins, 96% de ces cas de SHU sont sporadiques.

III-4. CLINIQUE DES INFECTIONS PAR LES EHEC

III-4-1. Les symptômes intestinaux

Les infections à EHEC dont la dose infectieuse est estimée à moins de 50 bactéries (Tilden JJ et coll., 1996) sont caractérisées par différents symptômes dont l'apparition se fait

Figure 11: Evolutions cliniques lors de l'infection par les EHEC



séquentiellement dans les 15 jours suivant l'ingestion de l'aliment contaminé. Après une incubation de 1 et 9 jours en moyenne après ingestion, les premiers symptômes apparaissent sous forme de diarrhée aqueuse modérée accompagnée de sévères douleurs abdominales spasmodiques et d'une déshydratation modérée. Dans 90% des cas, la diarrhée devient sanglante. Cette colite hémorragique (CH) dure 2 à 10 jours généralement sans apparition de fièvre malgré une hyperleucocytose. Elle peut en revanche être accompagnée de vomissements. Lors des CH, les lésions se localisent au niveau du caecum et du côlon. Il s'agit d'œdèmes, d'hémorragies et d'une nécrose de la muqueuse intestinale.

L'association entre les CH et les EHEC fut clairement établie par O'Brien *et al.* en 1983 (O'Brien AD and LaVeck GD, 1983), lorsque la même souche d'EHEC a été retrouvée à la fois dans la viande contaminée et dans les selles de malades.

Des complications pouvant mettre en cause le pronostic vital apparaissent dans 10% des cas une semaine environ après le début des troubles intestinaux. Ces complications se traduisent par des microangiopathies thrombotiques de deux types, le SHU et le PTT (Fig. 11).

III-4-2. Le SHU

La relation entre les EHEC et le SHU a été établie par Karmali et coll. en 1983 (Karmali MA et coll., 1983). Le SHU se caractérise par une triade associant anémie microangiopathique hémolytique (hémoglobine < 10 g/100 ml et schizocytose > 2%), une thrombopénie (nombre de plaquettes inférieur à 150000/mm^3) et une insuffisance rénale aiguë (créatinine > 60 µmol/l pour les enfants de moins de 3 ans) pouvant évoluer vers une insuffisance chronique. De plus, certains troubles du système nerveux central tels que léthargie, convulsions et encéphalopathies, sont observés chez 25% des patients souffrant de SHU (Tesh VL et coll., 1993). Ce syndrome touche principalement les enfants de moins de 5 ans et environ 10% des enfants de moins de 10 ans infectés par des EHEC développent un SHU environ une semaine après le début de la diarrhée. La mortalité suite à un SHU est comprise entre 5 et 10%. Parmi les survivants, 30% gardent des séquelles mineures (protéinurie) et 5% des séquelles majeures (insuffisance rénale chronique, déficits neurologiques définitifs).

III-4-3. Le PTT

La relation entre les EHEC et le PTT a été établie par Kovacs et coll. en 1990 (Kovacs MJ et coll., 1990). Le PTT est défini par une anémie hémolytique microangiopathique, une thrombocytopénie, de la fièvre, des troubles neurologiques et une insuffisance rénale aiguë

qui peut être modérée ou absente. On considère ce syndrome comme étant une forme clinique plus large mais plus fruste que le SHU. Il affecte surtout les personnes âgées. Cependant des cas de PTT ont également été observés chez des enfants. Le traitement actuel qui est seulement symptomatique permet de réduire la mortalité de 80%.

III-4-4. Mécanismes histopathologiques du SHU/PTT

La dysfonction endothéliale est un facteur crucial dans la séquence aboutissant à la thrombose des petits vaisseaux propres au SHU/PTT. Les Stx sont directement toxiques pour les cellules endothéliales et peuvent activer les leucocytes circulants qui adhèrent alors à la paroi vasculaire et lèsent directement les cellules endothéliales. Cette agression provoque une expansion sous-endothéliale aboutissant au rétrécissement ou à l'oblitération de la lumière vasculaire. Par ailleurs, l'endothélium endommagé libère, dans la microcirculation, des multimères de facteur von Willebrand (vWF) de très grandes tailles. Dans les conditions normales, l'écoulement du flux sanguin est laminaire et les multimères vWF circulent sous forme repliée. Sous l'effet des lésions de l'endothélium, l'écoulement du flux sanguin devient turbulent dans la lumière vasculaire rétrécie ; l'augmentation consécutive de la force de cisaillement empêche le repliement des multimères qui deviennent accessibles à l'activité de protéases circulantes qui clivent le vWF. Les fragments se lient aux plaquettes activées et contribuent à l'agrégation plaquettaire et à la formation des thrombi. Ces derniers se retrouvent principalement au niveau des reins, du côlon et du cerveau expliquant la symptomatologie de la maladie.

Par ailleurs, la Stx induit la production de TNF-α et d'IL-1β à partir des cellules inflammatoires. Ces dernières stimulent l'activation leucocytaire et amplifient les conséquences de l'inflammation et favorisent l'expression du récepteur de Stx, le globotriosyl céramide 3 (Gb3), à la surface des cellules endothéliales. Ces phénomènes favorisent et amplifient les dommages à l'endothélium et les thromboses.

III-4-5. Traitements

Une hydratation optimale pendant la phase de diarrhée glairosanglante et avant que ne se manifeste le SHU semble importante pour le maintien d'une fonction rénale satisfaisante. Les ralentisseurs du transit semblent favoriser l'émergence d'un SHU chez les patients présentant une diarrhée à EHEC et sont donc déconseillés. L'utilisation des antibiotiques est controversée. Plusieurs études montrent qu'ils ne sont pas efficaces (Bell BP et coll., 1997) et peuvent même représenter un facteur de risque plus important pour le développement d'un

SHU (Wong CS et coll., 2000). En effet, les antibiotiques peuvent induire la production de Stx et la lyse bactérienne (cf. III-5-3-a), entraînant ainsi la libération de quantités importantes de toxine dans la lumière intestinale.

Les traitements spécifiques du SHU/PTT visent donc à prévenir ou à limiter la cascade d'événements qui aboutissent à la thrombose intravasculaire et aux lésions tissulaires et sont donc essentiellement symptomatiques (Andreoli SP et coll., 2002). Lorsque l'insuffisance rénale se déclare, une perfusion rénale optimale doit être maintenue. La prise en charge de l'hypertension artérielle dans laquelle les vasodilatateurs sont les molécules de choix est par ailleurs envisagée. Enfin, l'apport de plasma (perfusion ou échange), en particulier dans les formes les plus sévères avec atteinte neurologique, est fortement recommandé. Les indications d'épuration extrarénale par dialyse sont essentiellement l'hyperkaliémie menaçante et l'anurie. L'ensemble de ces traitements permettent de diminuer la mortalité de 40 à 4% dans les cas de SHU et de 90 à 10% dans les cas de PTT (Gillis S et coll., 1996). Le taux de guérison sans séquelle est d'environ 70%.

Lorsque le SHU ou le PTT ne sont pas sensibles à l'apport de plasma, la néphrectomie bilatérale peut être un recours efficace chez les rares patients présentant un risque de mort imminente en raison d'une thrombopénie sévère associée à une hypertension réfractaire ou à des signes d'encéphalopathie hypertensive. Dans ces formes dramatiques, une rémission clinique et hématologique complète a été observée dans les deux semaines succédant à la néphrectomie.

En conclusion, il n'existe pas de traitement pour lutter contre l'infection par les EHEC. Les traitements du SHU visent à limiter *i*) les thromboses microvasculaires rénales en inhibant l'agrégation plaquettaire et *ii*) l'hypertension rénale.

III-4-5-a. De nouvelles pistes thérapeutiques

De nouveaux traitements destinés à prévenir l'exposition des organes cibles à la Stx sont en cours d'évaluation. Ainsi, des anticorps monoclonaux anti-Stx diminuent la mortalité lors d'une infection expérimentale par les EHEC chez la souris (Yamagami S et coll., 2001) et la probabilité d'apparition de symptômes neurologiques et la mortalité chez le porcelet gnotobiotique infecté (Sheoran AS et coll., 2005). Par ailleurs, l'administration de bactéries recombinantes produisant des analogues structuraux du récepteur de la toxine abolit complètement l'effet d'une dose létale de O157:H7 chez la souris (Paton AW et coll., 2000). Enfin, des composés peptidiques (Nishikawa K et coll., 2006) ou glucidiques (Synsorb Pk™ ;

Takeda T et coll, 1998) mimant le récepteur de la toxine ont pour but, après administration orale, de la séquestrer dans la lumière intestinale ; de tels composés ont néanmoins démontré leur inefficacité chez des enfants SHU (Trachtman H and Christen E, 1999) et de nombreuses études sont encore nécessaires afin de proposer des stratégies alternatives pour lutter contre les infections à EHEC.

III-4-6. Diagnostic

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

Néanmoins, malgré les techniques modernes de détection des STEC dans les denrées alimentaires, des aliments contaminés se retrouvent souvent sur le marché.

- **Isolement et identification des STEC**

E. coli O157:H7 peut être mis en évidence dans les selles par son caractère phénotypique particulier (absence de fermentation du sorbitol en 24 h) facilitant sa détection au sein d'une flore mixte sur un milieu approprié (gélose Mac Conkey-Sorbitol). La confirmation du diagnostic repose d'une part sur l'identification biochimique de la souche et d'autre part sur la recherche de l'antigène O157 à l'aide d'un sérum anti-LPS O157 et de l'antigène H7. Cependant, il existe des variations phénotypiques parmi les souches de ce sérotype avec possibilité de mutation vers un phénotype fermentant le sorbitol et nécessitant donc une autre méthode de détection. La mise en évidence d'autres sérotypes est plus complexe. L'identification de la souche productrice de toxine se fait par hybridation sur colonies à l'aide de sondes d'ADN spécifiques des gènes *stx1* et *stx2*. Les colonies productrices sont alors isolées puis typées. Ces techniques sont lourdes et ne sont pas applicables en routine.

Le recueil de selles doit être effectué au maximum 4 à 6 jours après le début des prodromes digestifs, les EHEC étant rapidement éliminés de l'intestin.

- **Mise en évidence des Stx libres**

La détection des Stx libres dans les selles s'effectue par l'étude de la cytotoxicité sur cellules Vero ou HeLa. Elle est spécifique si elle est neutralisée par un antisérum anti-Stx. Un ELISA peut être également envisagé.

- **Mise en évidence des gènes codant pour les toxines**

Du fait que les EHEC soient présents en très faible quantité dans les selles, l'amplification par PCR (pour polymerase chain reaction) des gènes codant pour les Stx représente une méthode sensible pour leur détection. La PCR est réalisée directement sur les selles ou à partir d'un écouvillon rectal.

- **Sérodiagnostic**

Dans le sérum du malade, le diagnostic repose sur la détection des anticorps sériques: augmentation des anticorps anti-Stx mais surtout recherche des anticorps anti-LPS pour les sérogroupes connus comme producteurs de Stx. Les anticorps sont détectables précocement et permettent d'attester de l'infection même plusieurs semaines après le début des prodromes digestifs.

III-5. LES MÉCANISMES MICROBIENS DE LA PATHOGÉNICITÉ

III-5-1. Résistance à l'acidité gastrique

Après ingestion par le consommateur, les EHEC transitent par l'estomac où ils doivent faire face au premier système de défense de l'hôte, l'acidité gastrique. Les EHEC possèdent plusieurs mécanismes pour répondre à cette agression. Chez *E. coli*, quatre systèmes de résistance à l'acidité ont été mis en évidence. Un système oxydatif, peu caractérisé, et trois systèmes dépendants d'acides aminés, le système arginine dépendant, le système lysine-dépendant (Foster JW et coll., 2004) et le système glutamate dépendant, qui semble être le plus efficace des quatre (Lin J et coll., 1996). Par ailleurs, il existe un îlot d'adaptation à l'acidité appelé AFI (pour Acid Fitness Island) qui porte des gènes impliqués dans la résistance au stress acide dû à des acides organiques faibles, et à une résistance induite à forte densité cellulaire (Masuda N and Church GM, 2003; Mates AK et coll., 2007). La plupart de ces mécanismes sont dépendants à la fois de la phase de croissance des bactéries (exponentielle ou stationnaire), de la densité cellulaire, des paramètres physico-chimiques (disponibilité en oxygène, source de carbone), du milieu de culture et du pH. Ces mécanismes permettent la survie des bactéries à différentes conditions environnementales de stress acide, telles que les conditions de l'estomac (pH 1 à 3 en présence d'acides minéraux) et de l'intestin (pH 5,5 à 7 en présence d'acides organiques faibles). Le régulateur général de réponse au stress acide est le facteur σ^s codé par le gène *rpoS* (Cheville AM et coll., 1996; Price SB et coll., 2000).

III-5-1-a. Le système oxydatif

Le système oxydatif est le mécanisme de résistance au stress acide le moins connu et reste moins efficace que les systèmes arginine-dépendant et glutamate-dépendant (Foster JW et coll., 2004). Il est induit chez les bactéries en phase stationnaire en présence d'oxygène. Il permet aux bactéries de résister dans un milieu minimum dont le pH peut atteindre une valeur de 2,5. Le mécanisme par lequel le système oxydatif protège *E. coli* du stress acide n'est pas clair. Il est décrit que ce système est réprimé par le glucose et dépendant de σ^s et de CRP (pour cAMP receptor protein) mais les gènes dépendants de ces deux systèmes n'ont pas été caractérisés.

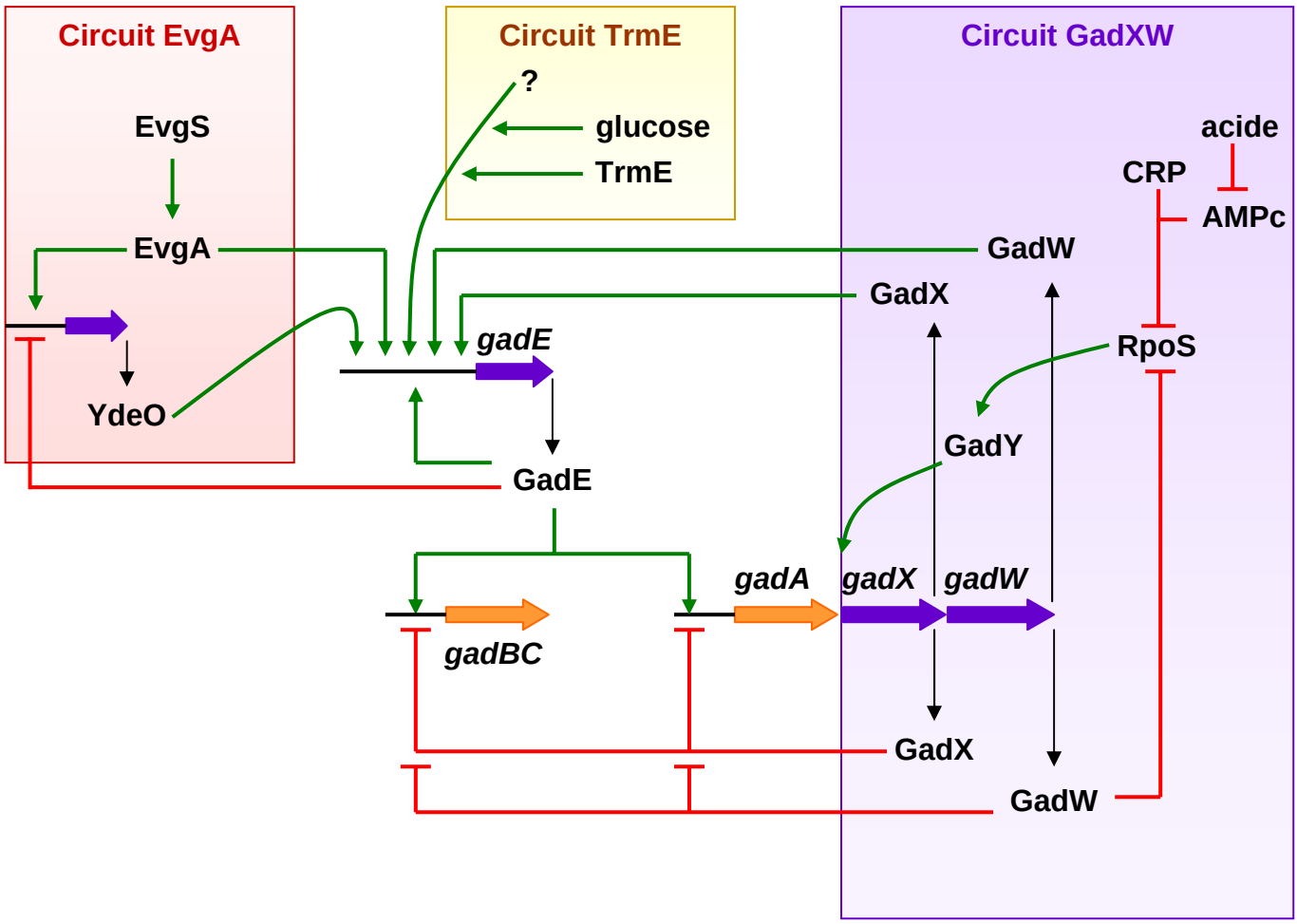
III-5-1-b. Le système glutamate-dépendant et arginine-dépendant

Ces systèmes permettent aux EHEC de résister dans un milieu minimum dont le pH peut atteindre une valeur de 2,5 mais auquel on a rajouté de l'arginine ou du glutamate. Les mécanismes d'action de ces systèmes sont bien connus et sont basés sur des réactions de décarboxylation d'acides aminés conduisant à la consommation d'un proton intracellulaire. Ces deux systèmes sont composés d'une décarboxylase et d'un transporteur. La glutamate décarboxylase (Gad), formée de GadA et GadB, et l'arginine décarboxylase AdiA permettent l'élimination d'un groupement carboxyl, porté par le glutamate et l'arginine, en CO_2 avec consommation d'un proton recruté dans le cytoplasme. La réaction aboutit à la production d'acide γ-amino butyrique *via* le système Gad et d'agmatine *via* AdiA. Les transporteurs GadC pour le glutamate et AdiC pour l'arginine permettent l'export de l'acide γ-amino butyrique et de l'agmatine et l'import de nouveaux acides aminés (glutamate et arginine).

III-5-1-c. Régulation des systèmes glutamate-dépendant et arginine-dépendant

La régulation du système glutamate-dépendant est complexe. Au moins 11 protéines régulatrices sont connues pour affecter l'induction de ce système. Une des plus importante est l'activateur central, GadE (anciennement appelé YhiE). GadE lie une séquence consensus appelée la '*gad* box' de 20 pb (TTAGGATTTTGTTATTTAAA ; Castanie-Cornet MP et coll., 2007) localisée en amont des sites de transcription de *gadA* et *gadBC*. La '*gad* box' et l'activateur GadE sont essentiels à l'expression de *gadA* et *gadBC* et donc essentielle à la résistance à l'acidité. Les dix autres régulateurs interviennent de façon plus ponctuelle en fonction de la phase de croissance et de la composition du milieu de culture.

Figure 12: Régulation des circuits de résistance à l'acidité dépendants du glutamate chez *E. coli*



Les gènes de régulation sont présentés en violet; les gènes de résistance à l'acidité sont en orange. L'activation des circuits EvgA, TrmE ou GadXW conduisent à l'expression du gène codant pour le régulateur transcriptionnel GadE. Ce dernier permet la transcription des gènes gadABC qui permettent la résistance à l'acidité. D'après Foster, 2004.

Trois grands circuits ont été décrits pour la régulation de l'expression de *gadE* (Fig. 12). Le premier circuit, dit EvgA, a été décrit par Masuda et Church (Masuda N and Church GM, 2003). Le complexe EvgAS est un système à deux composantes, EvgS étant le senseur membranaire et EvgA un régulateur transcriptionnel. Une surexpression de EvgA entraine de façon directe ou indirecte via YdeO, une résistance à l'acidité par l'induction de *gadE*. Ce mécanisme a été décrit pour des bactéries en phase exponentielle de croissance dans un milieu minimum. Aucune implication de ce système n'a été décrite en phase stationnaire.

Le deuxième circuit régulant le système glutamate-dépendant est le circuit TrmE (aussi connu sous le nom de MnmE). Ce circuit permet la synthèse de GadA et GadBC durant la croissance des bactéries en MLB contenant du glucose. Le rôle exact de TrmE n'est pas clairement défini mais il est capable d'induire la transcription de *gadE* qui permet la transcription de *gadA* et *gadBC* (Gong S et coll., 2004).

Enfin, le troisième circuit décrit est le circuit *gadXW* ; ces gènes forment un opéron. GadW est un régulateur négatif de la transcription de *gadX*. Des techniques de gel retard ont permis de montrer que GadX active directement *gadA* et *gadBC* en se fixant sur la '*gad* box' (Giangrossi M et coll., 2005; Tramonti A et coll., 2006). Cependant, une surexpression de GadX chez *E. coli* n'induit pas *gadA* ou *gadB* en absence de GadE (Gong S et coll., 2004). GadE et GadX peuvent se fixer simultanément sur la région autour de la 'gad box', probablement en formant un complexe (Ma Z et coll., 2003). Plus récemment, une étude a montré que RpoS active *gadY*, petit ARN non codant, qui stabilise l'ARNm de *gadX* et induit sa transcription, résultant en une induction de la transcription de *gadE* (Sayed AK et coll., 2007).

La régulation du système arginine-dépendant est beaucoup moins complexe. Le gène *adiA* (arginine décarboxylase) est localisé en amont de *adiC* (arginine/agmatine transporteur), ces deux gènes sont séparés par un troisième gène *adiY*. AdiY active l'expression de *adiA* et *adiC*, cependant les conditions nécessaires à son activation n'ont pas été totalement définies (Stim-Herndon KP et coll., 1996).

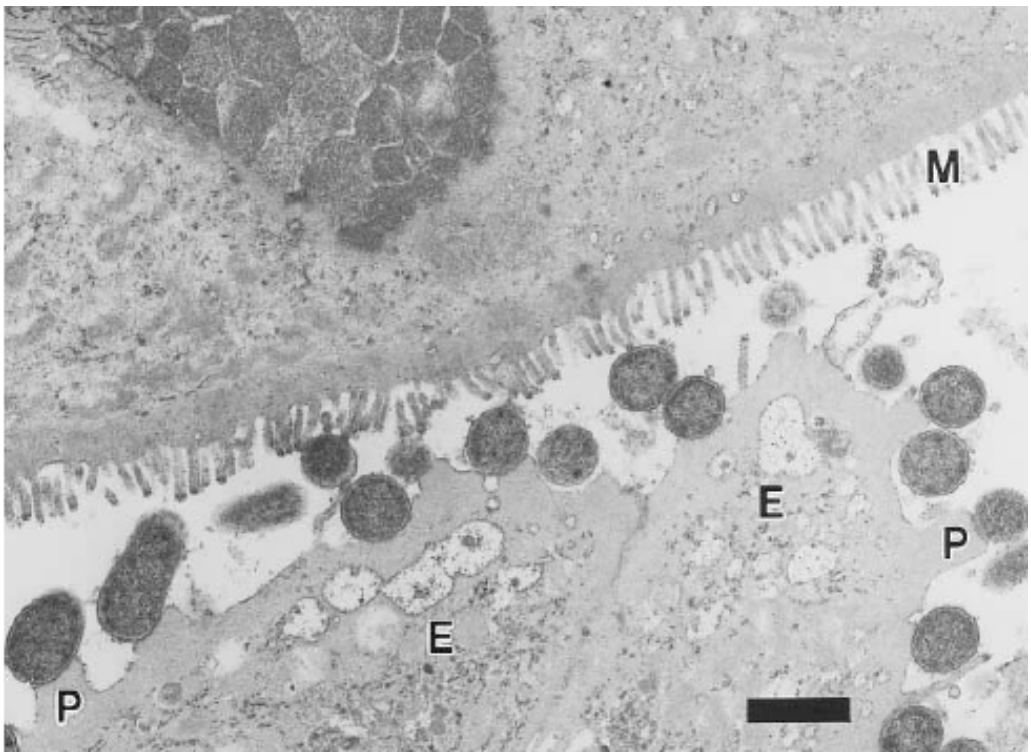
III-5-2. Attachement aux cellules épithéliales et perturbations du cytosquelette

Toutes les souches de STEC appartenant aux séropathotypes A et B (O157:H7, O157:NM, O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H21, O145:NM) possèdent des facteurs de virulence leur permettant d'adhérer de façon intime aux cellules épithéliales. Suite à cette adhésion, les EHEC induisent une perturbation de la signalisation de la cellule hôte et un réarrangement du cytosquelette qui provoque un effacement des microvillosités intestinales et l'apparition d'un

Figure 13: Le piédestal d'actine sous une bactérie EPEC

Formation du piédestal à la surface de cellules HeLa infectées par la souche EPEC E2348/69 (Knutton et coll., 1998).

Figure 14: Lésions A/E induites par une souche O157:H7 sur des cellules rectales de mouton



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

piédestal sous la bactérie (Sherman PM and Soni R, 1988; Frankel G et coll., 1995; Fig. 13). L'ensemble de ces modifications cellulaires est appelé lésion d'attachement et d'effacement (A/E ; Fig. 14).

La plupart des gènes nécessaires à la formation de lésions A/E sont localisés sur un îlot de pathogénicité de 43,36 kb appelé locus d'effacement des entérocytes (LEE) situé sur le chromosome bactérien (Fig. 15). Le LEE est organisé en 5 opérons majeurs : LEE1, LEE2, LEE3, LEE5 et LEE4.

Un locus similaire est également présent chez les EPEC et chez *Citrobacter rodentium*. Les EPEC sont responsables de diarrhées aqueuses chez les jeunes enfants et les nourrissons majoritairement dans les pays en voie de développement, mais également dans les pays industrialisés ; *C. rodentium* est une bactérie pathogène des souris induisant des symptômes similaires à ceux des EPEC chez l'homme. Ces deux bactéries peuvent induire des lésions A/E comme les EHEC.

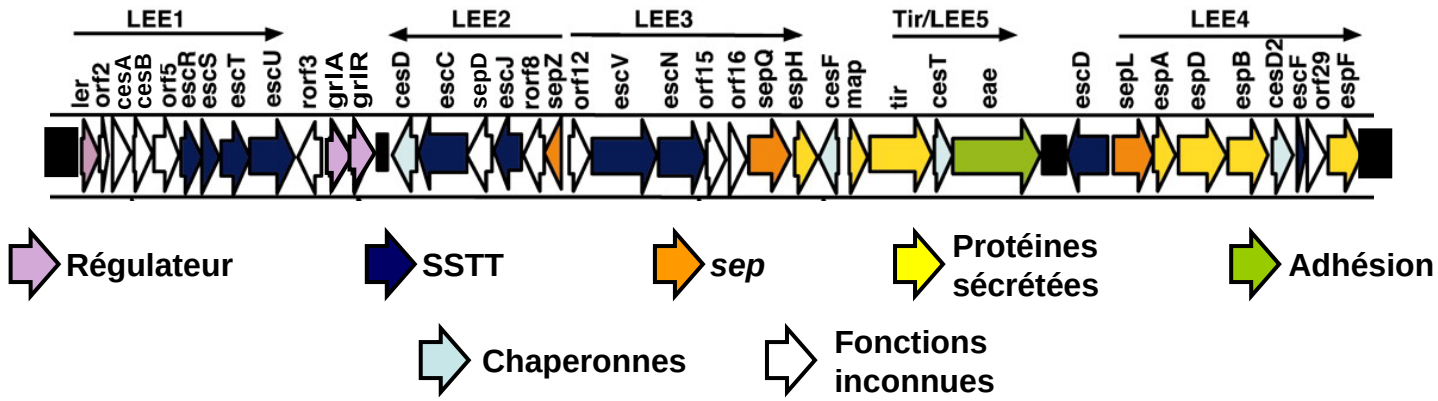
III-5-2-a. L'attachement intime

Le LEE 5 contient le gène *eae* codant pour une adhésine, l'intimine Eae (pour *E. coli* attaching and effacing), et le gène *tir* codant pour Tir (pour translocated intimin receptor), le récepteur de l'intimine. Entre les gènes *tir* et *eae* se trouve le gène *cesT* qui code pour une protéine chaperon de la protéine Tir.

L'intimine Eae est une protéine de membrane externe de 94 kDa qui permet l'adhésion intime des bactéries à l'épithélium intestinal. Des EHEC O157:H7 invalidés pour le gène *eae* sont incapables de coloniser, de former des lésions A/E et d'induire des signes cliniques de SHU chez le jeune lapin (Ritchie JM et coll., 2003). La séquence nucléotidique de l'intimine des STEC présente seulement environ 49% d'homologie avec la séquence de l'intimine des EPEC. Cette différence expliquerait pourquoi les STEC adhèrent seulement à l'épithélium du côlon alors que les EPEC adhèrent à l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon chez le porcelet (Yu J and Kaper JB, 1992). Lorsque le gène cloné de l'intimine des EPEC est introduit dans une souche de EHEC dépourvue de son propre gène *eae*, celle-ci devient capable d'adhérer à l'épithélium de l'intestin grêle (Tzipori S et coll., 1995).

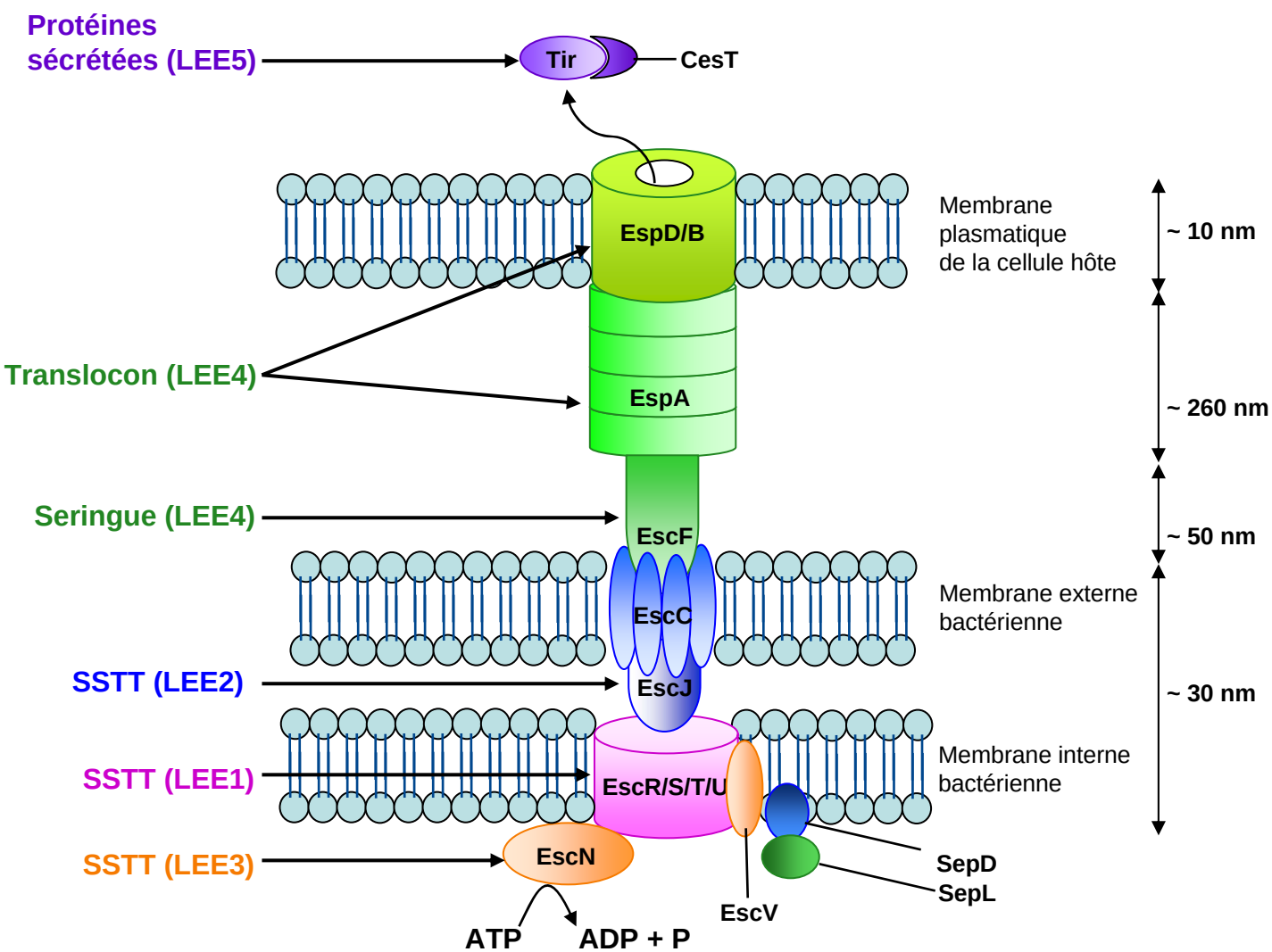
Six variants α, β, γ, δ, ε, et ζ de l'intimine ont été identifiés. Les gènes *eaeα*, *eaeβ*, et *eaeγ* ont été mis en évidence respectivement chez la souche EPEC E2348/69, la souche RDEC isolée de lapin et la souche EHEC O157:H7 EDL933 (China B et coll., 1999). Les gènes *eaeδ*, *eaeε* et *eaeζ* ont été isolés de souches humaines de sérotype O157:H7 associées à

Figure 15: Organisation génétique du LEE chez E. coli O157:H7



D'après Deng et coll., 2004 et Garmendia et coll., 2005.

Figure 16: Structure du SSTT



D'après Garmendia et coll., 2005.

des SHU (Adu-Bobie J et coll., 1998). C'est la partie C-terminale de l'intimine, responsable de la reconnaissance spécifique de la cellule eucaryote, qui est la plus divergente. Elle pourrait être responsable de la différence de tropisme tissulaire observée entre les EPEC (au niveau de l'intestin grêle) et les EHEC (au niveau du caecum et du côlon) le long du tube digestif.

Le gène *tir* code pour la protéine Tir de 78 kDa. Cette dernière est transférée de la bactérie à la cellule eucaryote par le système de sécrétion de type III (SSTT). Elle s'insère dans la membrane cytoplasmique de la cellule hôte et sert de récepteur pour l'intimine. Trois variants α, β et γ du gène *tir* ont été décrits chez les EPEC et les EHEC (China B et coll., 1999). Tir forme *i*) une structure en épingle à cheveux avec les domaines C- et N-terminal localisés dans la cellule hôte et *ii*) une région transmembranaire extracellulaire qui interagit avec l'intimine.

L'interaction entre l'intimine et son récepteur Tir établit donc une adhésion intime aux entérocytes (Donnenberg MS et coll., 1993; McKee ML et coll., 1995). Cette adhésion induit un remaniement de l'actine cellulaire qui forme un piédestal sous la bactérie (Fig. 13). Néanmoins, d'autres récepteurs, non bactériens, existent sur l'épithélium intestinal. Ainsi, les intégrines β1 et la nucléoline sont des récepteurs potentiels de l'intimine (Sinclair JF et coll., 2006).

III-5-2-b. Mode d'injection d'effecteurs bactériens dans la cellule hôte

Les STEC peuvent injecter des molécules effectrices dans les cellules épithéliales auxquelles elles adhèrent. La machinerie qui permet cette injection est composée d'un SSTT formant un pore à travers lequel les protéines sont sécrétées, d'une seringue et d'un translocon qui s'insère dans la membrane des cellules eucaryotes telle une aiguille (Fig. 16).

- **Le SSTT**

Le SSTT est associé à la virulence de nombreux pathogènes à Gram négatif. Il est utilisé par les pathogènes pour sécréter les facteurs de virulence directement dans la cellule hôte. L'assemblage du SSTT est séquentiel. Les fondations de la seringue, servant au transport des protéines bactériennes dans la cellule hôte, sont dépendantes de la voie *sec*. A partir de ces fondations, la seringue est ensuite élaborée de façon *sec*-indépendante et permet le transfert des protéines. Ce transfert nécessite la consommation d'ATP. EscC (LEE2) et EscV (LEE3) sont les principaux composants des fondations de la seringue. On les retrouve dans la membrane de la bactérie. EscC est retrouvée communément dans tous les SSTT. EscC est

impliqué dans le transport de molécules à travers la membrane externe. EscV possède 7 domaines transmembranaires et interagit avec la membrane interne. EscJ (LEE2) forme un cylindre fonctionnant comme un pont dans l'espace périplasmique pour relier les deux membranes. Le fonctionnement du SSTT semble dépendant de l'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase EscN (LEE3), mais le mécanisme moléculaire précis n'a pas encore été démontré (Gauthier A and Finlay BB, 2003). Enfin, SepD et SepL sont des composants cytoplasmiques du SSTT. SepD (LEE2) est associé à la membrane bactérienne et fixe SepL (LEE4) ; ce dernier fixe Tir pour permettre son injection via le SSTT (Wang D et coll., 2008).

Les gènes codant pour le SSTT sont très conservés entre la souche EPEC E2348/69 et la souche EHEC EDL933, avec 98 à 100% d'homologie (Friedberg D et coll., 1999).

- **La seringue**

La seringue est composée d'une seule protéine, EscF qui possède une forte homologie avec PrgI chez *Salmonella*, YscF chez *Yersinia* et MiH chez *Shigella*. Le gène codant pour EscF est porté par le LEE4. La seringue EscF forme un canal pour la sécrétion de protéines dépendante du SSTT. Un mutant escF abolit la sécrétion du translocon et des protéines effectrices (Sekiya K et coll., 2001).

- **Le translocon**

Le SSTT des EPEC/EHEC est caractérisé par la présence d'une extension filamenteuse associée à la seringue EscF appelée translocon. Ce translocon est formé des protéines Esp (pour E. coli secreted proteins) ; les gènes codant pour les protéines Esp font partis du LEE4.

La protéine EspA de 25 kDa est un composant majeur de la surface de la bactérie durant la formation de la lésion A/E. Cette protéine forme un large filament extra cellulaire à la surface de la bactérie, constituant un "tunnel", entre la surface de la cellule hôte et la bactérie, par lequel sont transloqués des effecteurs dont Tir ou EspB (Neves BC et coll., 1998).

Après avoir été injectée dans les entérocytes, la protéine EspB (37 kDa) s'insère dans la membrane cytoplasmique et complète le translocon. Egalement localisée dans le cytoplasme, EspB participe à la rupture des réseaux d'actine et à la formation du piédestal. Elle est aussi impliquée dans la transduction de signaux en faisant intervenir la voie de la protéine kinase (PK)-C-γ1 (Kenny B and Finlay B, 1997).

La protéine EspD (40 kDa) aurait un rôle au niveau de la stabilisation des filaments EspA et ferait partie intégrante de l'appareil de translocation, en favorisant le passage des protéines effectrices dans la cellule cible (Kresse AU et coll., 1999). Le gène *cesD*, situé en

aval du gène *escC*, code pour une protéine chaperon essentielle pour la sécrétion des protéines EspD et EspB (Wainwright LA and Kaper JB, 1998).

Les gènes codant pour les protéines Esp montrent une divergence génétique plus importante que les gènes du SSTT entre les EHEC et les EPEC: *espB*, 74% d'homologie ; *espA*, 84.6% d'homologie ; *espD*, 80.4% d'homologie.

III-5-2-c. Les effecteurs bactériens injectés

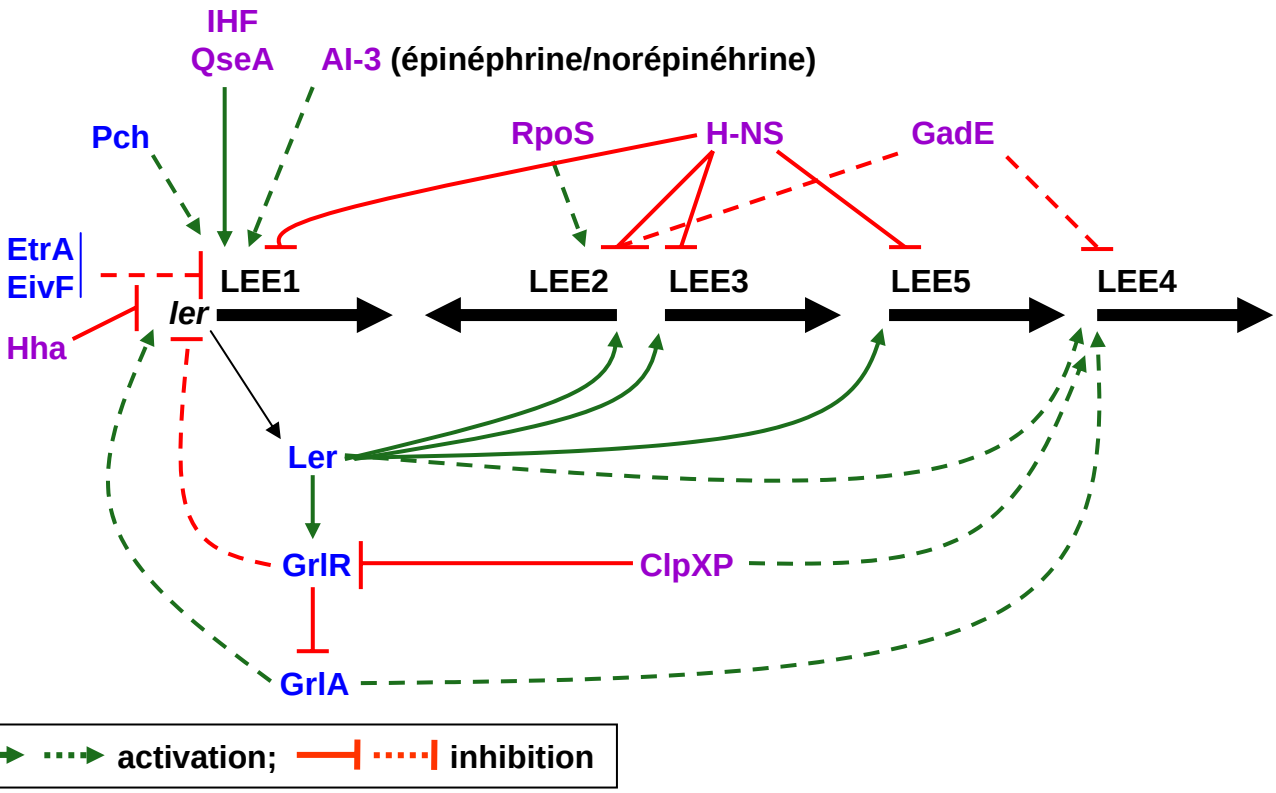
Certains effecteurs injectés par le SSTT sont codés par des gènes du LEE :

- **Map** : Cette protéine possède 3 fonctions distinctes. Map permet *i*) de maintenir le potentiel membranaire mitochondrial ; *ii*) la formation des structures filamenteuses du SSTT et *iii*) d'induire des dommages dans la barrière intestinale et d'altérer les jonctions serrées. Des études réalisées sur des souris infectées par *Citrobacter rodentium* ont montré que Map n'est pas essentiel à la colonisation et au développement de l'infection (Deng W et coll., 2004).
- **EspF** : EspF est une protéine riche en région proline. EspF joue un rôle dans la modification de la barrière épithéliale intestinale. Comme Map, EspF cible les mitochondries de la cellule hôte et entraine une perméabilisation de la membrane mitochondriale avec un clivage des caspases 9 et 3 indiquant qu'EspF joue un rôle dans l'apoptose. Des études utilisant des cultures d'organes intestinaux humains ont montré qu'EspF joue un rôle direct dans le remodelage de la bordure en brosse des microvillosités (Viswanathan VKP and Hecht GMD, 2000).
- **EspG** : EspG cible la formation d'actine et la destruction des microtubules. EspG intéragit avec les tubulines et stimule la déstabilisation des microtubules *in vitro*. Un mutant Δ*espG* entraine une legère atténuation de l'infection dans un modèle d'infection par les EPEC chez le lapin (Deng W et coll., 2004).
- **EspH** : EspH est localisé dans la membrane de la cellule hôte et module la structure du cytosquelette d'actine affectant la formation du piedestal. EspH ne joue pas un rôle critique *in vivo*, cependant, son rôle précis dans l'infection n'est pas connu.
- **SepZ** : SepZ est la plus récente protéine effectrice codée par le LEE identifiée. Sa translocation n'a pas été attribuée à une fonction spécifique.

D'autre part, d'autres protéines effectrices non codées par le LEE ont été identifiées :

- **EspI** : EspI est également appelé NelA pour non LEE-encoded effector A. EspI est porté par un prophage CP-933P. EspI n'est pas nécessaire aux formations des lésions

Figure 17: Modèle de régulation du LEE



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

A/E. Il est connu pour jouer un rôle crucial mais inconnu dans la virulence de *C. rodentium* chez la souris (Mundy R et coll., 2004).

- **$EspF_u$** : $EspF_u$ (Tccp) est une protéine riche en proline. Elle est portée par un prophage CP-933P. EspFu joue un rôle essentiel dans l'adhésion des EHEC et, est associé à Tir et à N-WASP pour stimuler la polymérisation d'actine conduisant à la formation d'un piedestal (Garmendia J et coll., 2004). Le gène codant pour $EspF_u$ est retrouvé dans le génome des EHEC mais pas dans celui des EPEC (Garmendia J et coll., 2004).

III-5-2-d. Régulation de l'expression des gènes du LEE

La régulation de l'expression des opérons du LEE est assurée soit par des régulateurs retrouvés exclusivement chez les EHEC, soit par des régulateurs globaux du métabolisme des *E. coli* (Fig. 17).

- **Le régulateur Ler**

Le premier gène du premier opéron du LEE code pour un activateur transcriptionnel, Ler. Ce dernier active la transcription des opérons LEE2, LEE3, et LEE5 en se fixant sur la région promotrice TACTCT (Mellies JL et coll., 2007). L'activation de l'expression de LEE4 est controversée chez les EHEC. Sharma et Zuerner ont démontré qu'une fusion 'opéron du LEE4-lacZ' réalisée dans un mutant 86-24 Δ*ler* entraine une très faible production de β-galactosidase et donc que Ler agit comme un régulateur positif sur l'expression des gènes *esp* (Sharma VK and Zuerner RL, 2004). Par ailleurs, ces auteurs ont décrit que Ler se fixe sur la région promotrice du LEE4 (Sharma VK and Zuerner RL, 2004). De façon contradictoire, Elliot et coll. ont montré une forte augmentation des protéines EspABD en absence de Ler (Elliott SJ et coll., 2000).

Deux autres régulateurs spécifiques de l'expression du LEE sont également codés par le LEE lui-même : GrlR et GrlA, qui sont respectivement un répresseur et un activateur de la transcription de *ler* (Deng W et coll., 2004). Ler active la transcription de l'opéron *grlRA*, ce qui crée une boucle de régulation nécessaire à une expression optimale du LEE. De plus, deux protéines non codées par le LEE, EtrA et EivF, répriment l'expression de l'opéron *grlRA* (Zhang L et coll., 2004).

Chez les EPEC, la régulation du LEE est contrôlée par le régulateur Per (pour plasmid encoded-regulator) porté sur un plasmide. Per est codé par un locus composé de *perA, perB* et *perC*. Des études ont montré que Per induit la transcription de l'ensemble du LEE en activant l'expression de *ler* (Mellies JL et coll., 1999).

- **Le quorum sensing**

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

Cependant, le quorum sensing peut également inhiber l'expression du LEE. Dans ce cas, le régulateur SdiA semble impliqué dans cette inhibition. SdiA est activé par l'AI-1. Chez *E. coli*, il semble que l'indole puisse se substituer aux AHL (acyl homosérine lactones) pour activer SdiA (Lee J et coll., 2007). Il a été montré qu'une surexpression de SdiA provoque une inhibition de la transcription de l'opéron LEE4, ce qui laisse supposer qu'en phase stationnaire de croissance, quand SdiA est activée par l'indole, il inhibe l'expression de certains gènes du LEE. Ceci aurait pour conséquences de limiter l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales et de favoriser, soit la colonisation d'un autre site dans l'intestin, soit l'excrétion de la bactérie pour permettre la colonisation d'un autre hôte (Kanamaru K et coll., 2000).

- **Le système Gad**

Le régulateur GadE, qui induit les mécanismes de résistance à l'acidité chez *E. coli* (cf. III-5-1), réprime l'expression du LEE1, du LEE2, du LEE4 et du LEE5 indépendamment de Ler dans la souche Sakaï (EHEC O157:H7). En effet, Tatsuno et coll. ont montré *i*) une augmentation de l'expression des gènes *escU*, *escC*, *esp* et *tir* dans un mutant Δ*gadE* sans modification de l'expression de *ler* et *ii*) une augmentation de l'adhésion des bactéries aux cellules Caco-2 dans un mutant *gadE* (Tatsuno I et coll., 2003).

Chez les EPEC, il a été montré une inhibition du LEE5 dans une souche sur-exprimant *gadX*. Cette inhibition se fait via une inhibition de *perA* par GadX (Shin S et coll., 2001). Ces auteurs ont par ailleurs établit que la protéine GadX se fixe sur les régions promotrices de *perA*, *gadA* et *gadB* (Shin S et coll., 2001). Cependant, il faut noter que ces auteurs n'ont pas évoqué le rôle potentiel de GadE sur l'expression du LEE chez les EPEC, car ce facteur n'a été identifié qu'en 2003 (Ma Z et coll., 2003).

➢ **Autres régulateurs**

Plusieurs régulateurs globaux contrôlent l'expression du LEE. La protéine H-NS est impliquée dans la thermorégulation du LEE en réprimant la transcription de LEE1 (et donc de *ler*) à 27°C mais pas à 37°C (Umanski T et coll., 2002). La protéine IHF active l'expression de *ler* (Friedberg D et coll., 1999), alors que la protéine HhA la réprime en se fixant directement sur l'ADN ou en se dimérisant avec H-NS (Sharma VK and Zuerner RL, 2004). La protéase ClpXP influence l'expression du LEE en interagissant avec RpoS et GrlR (Iyoda S and Watanabe H, 2005). Il a été montré aussi qu'un petit ARN non codant, DsrA, active la transcription de *ler* en interagissant avec RpoS (Laaberki MH et coll., 2006).

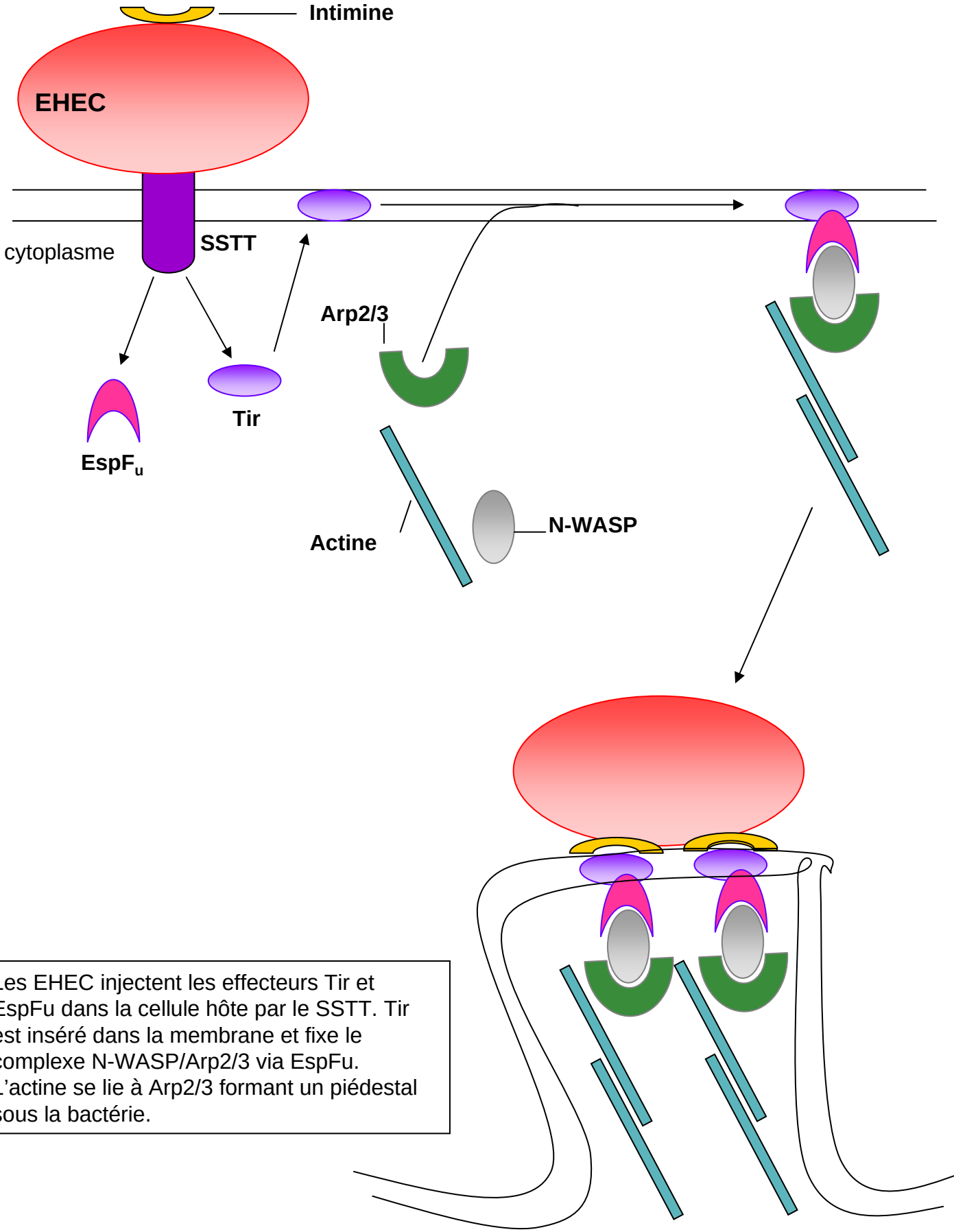
Toutes ces données montrent que la régulation de l'expression du LEE est un phénomène complexe qui n'est pas totalement élucidé. L'expression de ce locus est régulée très finement, certainement en réponse à une grande variété de signaux environnementaux.

III-5-2-e. Un modèle d'interaction des EHEC aux cellules épithéliales

La première étape du modèle est l'adhésion de la bactérie à la cellule épithéliale intestinale. L'intimine joue un rôle primordial dans cette étape, mais il est possible que d'autres facteurs d'adhésion soient impliqués avant le contact intime réalisé par la reconnaissance de l'intimine et de son récepteur.

Tir est inséré dans la membrane plasmique de la cellule hôte par la machinerie du SSTT. Chez les EPEC, Tir est phosphorylé sur un résidu tyrosine par une kinase eucaryote et fixe alors la protéine adaptatrice NcK ; ce dimère Tir-P/NcK migre dans la membrane cytoplasmique de la cellule hôte et recrute l'actine via les adaptateurs Arp2/3 et N-WASP. En revanche, la protéine Tir des EHEC n'est pas phosphorylée lorsqu'elle est injectée dans la cellule. La fixation du complexe N-WASP/Arp2/3/actine dépend de la protéine bactérienne $EspF_u$ qui est injectée de façon dépendante du SSTT (Garmendia J et coll., 2006). $EspF_u$ se lie à N-WASP sur un domaine auto-inhibiteur appelé GBD, libérant ainsi une région VCA qui lie Arp2/3 (Cheng HC et coll., 2008). Ces évènements conduisent à la dépolymérisation localisée des fibres d'actine dans les microvillosités conduisant à la rétractation et à l'effacement de ces microvillosités. Les composants du cytosquelette sont réarrangés, et la protéine Tir devient le noyau autour duquel l'actine est re-polymérisée au-dessous de la bactérie adhérente. Cette dernière semble être posée sur une structure en forme de piédestal qui peut mesurer jusqu'à 10 µm de haut (Fig. 13). La formation du piédestal est un processus dynamique, les piédestaux

Figure 18: Remodélisation de l'actine au contact des EHEC



Les EHEC injectent les effecteurs Tir et EspFu dans la cellule hôte par le SSTT. Tir est inséré dans la membrane et fixe le complexe N-WASP/Arp2/3 via EspFu. L'actine se lie à Arp2/3 formant un piédestal sous la bactérie.

pouvant onduler et basculer, s'allongeant et se raccourcissant alternativement tout en restant à la même place sur la surface cellulaire. Ce modèle est présenté Fig. 18.

III-5-3. Les symptômes hémorragiques

Toutes les souches STEC se caractérisent par la présence dans leur génome, des gènes codant pour la Stx. Plus précisément, il existe deux types de Stx : Stx1 et Stx2.

III-5-3-a. Régulation de l'expression des gènes *stx*

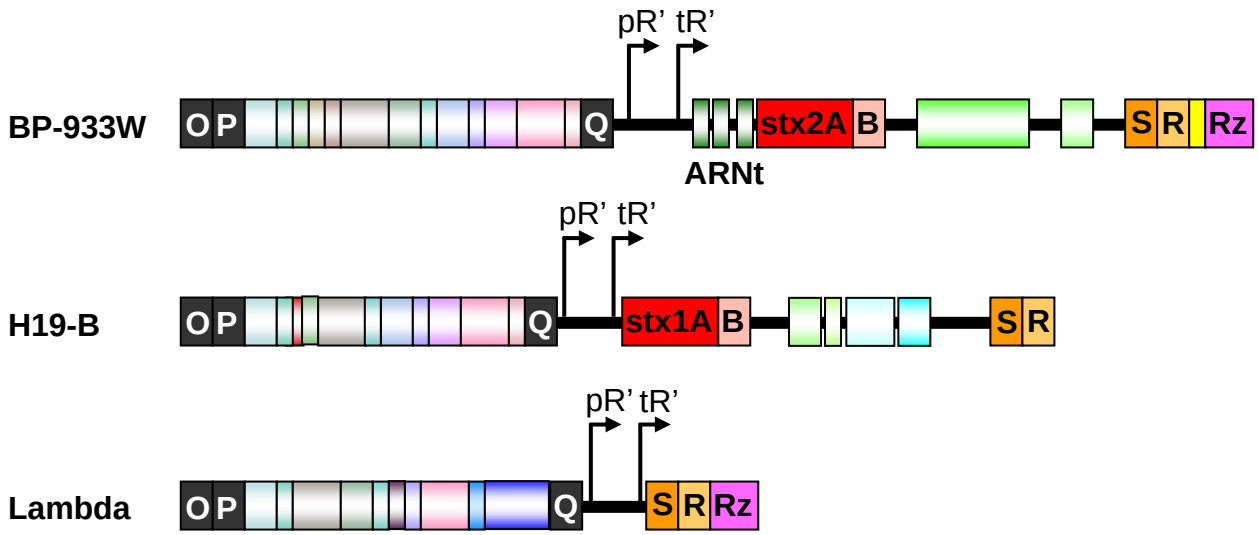
- **Régulation transcriptionelle**

L'analyse génétique des souches O26:H11 et O157:H7 a révélé que les gènes *stx1* et *stx2* sont portés par des prophages de type λ insérés dans le génome bactérien (Scotland SM et coll., 1983; O'Brien A et coll., 1984; Fig. 19) La taille du génome de différents phages est variable et a été estimée entre 47 kb et 70 kb (Willshaw GA et coll., 1987; Rietra PJ et coll., 1989). Les phages porteurs des gènes *stx* possèdent un double brin d'ADN et appartiennent à la famille des phages Siphoviridae et Myoviridae. Ces phages sont de forme hexagonale avec une courte queue.

Les phages portant les gènes *stx2* sont inductibles comme les autres phages de type λ et répondent à un système bactérien de réponse au stress : le système SOS (Fig. 20). L'expression spontanée du gène *stx2* est dépendante du système SOS. Fuchs et coll. ont montré que la production de Stx2 et la synthèse de phages stx2 sont fortement diminuées dans un mutant *recA* (Fuchs S et coll., 1999). En revanche, la production de Stx1 ne semble pas dépendante de la réponse SOS.

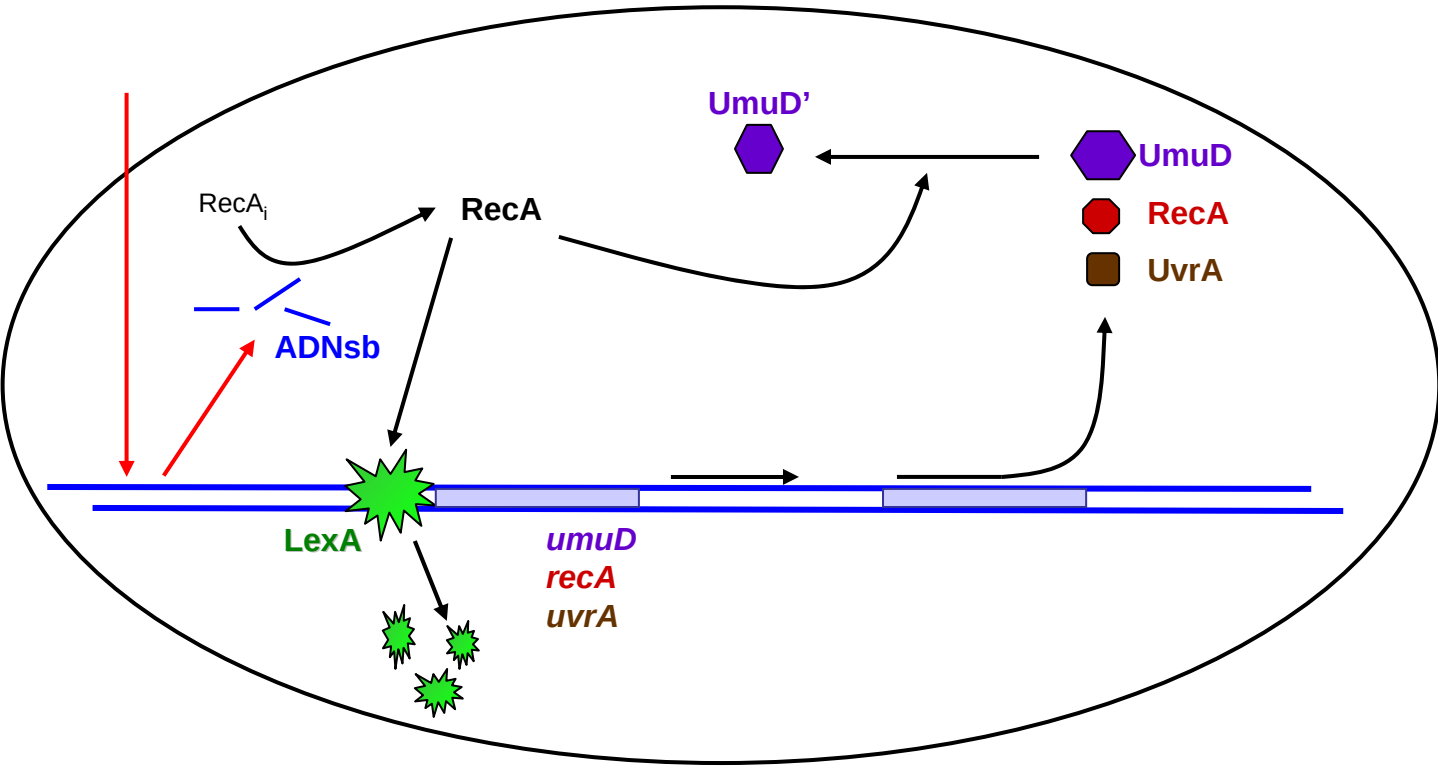
Le système SOS est mis en place dans la cellule bactérienne lorsqu'il y a accumulation d'ADN simple brin dans la cellule suite à des dommages lors d'une irradiation aux UV, lors d'une alkylation de l'ADN, ou lors de tout autre processus d'altération de l'ADN (Sutton MD et coll., 2000). La réplication de l'ADN est alors bloquée, et la réponse SOS se met en place. Le régulateur majeur de la réponse SOS est la protéine RecA, présente en faible quantité mais de façon constante dans la bactérie. La protéine RecA peut se fixer sur l'ADN simple brin pour former des filaments et acquérir ainsi une activité protéase. RecA ainsi activée induit l'auto-clivage du répresseur LexA qui réprime les gènes du régulon SOS. Parmi les gènes du régulon SOS figurent les gènes *lexA*, *recA*, les gènes *uvr* impliqués dans la réparation des dommages liés aux UV, le gène *sulA* qui inhibe la division cellulaire afin de laisser le temps nécessaire à la réparation de l'ADN (Janion C et coll., 2001). Ces gènes possèdent sur leur promoteur un site de fixation de LexA nommé SOS box. Dans le génome de *E. coli*, 1% des

Figure 19: Représentation schématique des phages



Les gènes O et P représentent les origines de réplication, Q code pour un anti-terminateur, S, R et Rz codent les protéines de lyse nécessaires pour la libération des particules phagiques. Trois ARNt sont localisés en amont du gène *stx2* du phage BP-933W. D'après Schmidt, 2001.

Figure 20: Induction de la réponse SOS bactérienne



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

gènes (70) possèdent une SOS box sur leur promoteur (Fernandez de Henestrosa AR et coll., 2000). La réponse SOS est donc un phénomène cellulaire global dont l'activation est sous la dépendance de nombreux phénomènes physiques ou biologiques qui peuvent aller d'une simple variation de pH à l'action d'antibiotiques ayant un effet sur l'ADN, comme la mitomycine C (MC) ou les quinolones.

RecA induit aussi l'auto-clivage du répresseur cI du phage λ. Le prophage est maintenu en phase lysogénique par le répresseur cI produit par l'expression constitutive des gènes présents sur le phage lui-même. Ce répresseur se fixe sur des opérateurs présents sur les promoteurs des gènes précoces du phage, *pL* et *pR*. Les gènes *stx* sont situés en aval d'un autre promoteur tardif du phage, *pR'* (Plunkett Gr et coll., 1999; Wagner PL et coll., 2001). Un terminateur de transcription assure l'inefficacité de ce promoteur lors de la lysogénie. En revanche, lorsque le phage est induit, le répresseur cI est clivé, l'expression des gènes précoces (de réplication du phage notamment) est rendue possible. Parmi ces gènes précoces se trouve aussi le gène codant pour l'antiterminateur Q. Cet antiterminateur permet la transcription des gènes tardifs du phage, dont les gènes *stx* et les gènes de lyse, à partir du promoteur *pR'*.

L'absence de RecA dans les EHEC diminue considérablement la production de phages stx2, ce qui se traduit par une totale avirulence de la souche *in vivo* (Fuchs S et coll., 1999). Une étude parue en 2003 a évalué l'effet d'un traitement à la MC sur des souches STEC provenant de diverses origines (bovines ou humaines responsables de SHU). Au cours de cette étude, il a été mis en évidence que le gène *stx1* était peu induit en présence de MC dans la plupart des souches, tandis que le gène *stx2* était fortement induit dans la quasi totalité des souches (Ritchie JM et coll., 2003). Cette observation a conduit à l'hypothèse que dans la plupart des souches, les gènes *stx1* sont situés sur des prophages défectifs.

- **Les différents variants des gènes *stx***

Il existe plusieurs variants Stx dans les deux classes. Le groupe Stx1 apparaît comme le plus homogène. Dans la plupart des cas les gènes *stx1* de différentes souches présentent la même séquence nucléotidique (Zhang W et coll., 2002). Paton *et coll.* ont comparé les séquences de 3 souches STEC et ont montré que les 3 gènes *stx1* présentaient 99% d'identité de séquence avec la séquence du phage 933J qui porte stx_1 dans la souche de référence EDL933 (Paton AW et coll., 1993; Paton AW et coll., 1995). Malgré cette grande homogénéité, plusieurs variants *stx1* ont été décrits: stx_1, stx_{1c}, stx_{1d} (Koch C et coll., 2001; Burk C et coll., 2003).

On distingue plusieurs variants pour la toxine Stx2 dont la nomenclature n'est pas très claire, et qui porte souvent à confusion, les auteurs ne donnant pas toujours le même nom au même variant : Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2-vha (Stx2d1), Stx2-vhb (Stx2d2), Stx2-vhc, Stx2e, Stx2f, Stx2-OX3A, Stx2-OX3b, Stx2-O111, Stx2-O48, Stx2-O118, Stx2-NV206 (Ito H et coll., 1990; Paton A et coll., 1995). Les variants Stx2d1 et Stx2d2 possèdent une caractéristique particulière. Tous deux possèdent un site de clivage par l'élastase présente dans le mucus intestinal. L'élastase clive la sous unité A et rend ainsi les toxines actives (Kokai-Kun JF et coll., 2000). Chaque nouvelle étude ou presque portant sur un nombre important de souches révèle un ou plusieurs nouveaux variants. Tous ces variants décrits sur la base de différences de séquence nucléotidique ne varient que très peu en terme de séquence protéique, et par conséquent il est probable que ces différences soient muettes en terme d'activité biologique. Récemment, il a été décrit que le variant Stx2 est principalement associé aux souches de séropathotype A tandis que la plupart des souches du séropathotype C possède le variant Stx2-vhb (de Sablet T et coll., 2008).

- **Facteurs environnementaux modulant l'expression de *stx***

La synthèse de la Stx de *S. dysenteriae* est dépendante de la concentration en fer. En 1982, il a été montré que la production de Stx1 chez *E. coli* est aussi réprimée en présence de fer (O'Brien AD et coll., 1982), et que cette régulation était sous le contrôle du régulateur transcriptionnel Fur (Calderwood SB and Mekalanos JJ, 1987), qui se fixe probablement en amont du promoteur *pstx1*. Cependant, la concentration en fer étant faible dans l'intestin, le promoteur *pstx1* est probablement déréprimé et par conséquent il est peu probable que cette répression joue un rôle important *in vivo*. La synthèse de Stx2, quant à elle, n'est pas réprimée en présence de fer (Sung LM et coll., 1990).

De nombreux facteurs produits par l'hôte peuvent également moduler la production de Stx. Ainsi, H_2O_2 produit par les neutrophiles induit la production de Stx2 (augmentation de 4 fois par rapport à la souche sauvage). Par contre dans un mutant délété du promoteur tardif du phage stx mis en contact avec des neutrophiles, l'augmentation de Stx2 n'est plus observée ce qui suggère que H_2O_2 induit la production de Stx2 via une induction du phage portant les gènes *stx2* (Wagner PL et coll., 2001).

De récents travaux ont montré que le microbiote intestinal humain pouvait inhiber la production de Stx chez une souche d'EHEC O157: H7. La flore fécale humaine entraine une inhibition de la synthèse de Stx2 et de la production de phages stx2. Cette inhibition est

Figure 21: Représentation tridimensionnelle de Stx2

La sous-unité A portant l'activité enzymatique est représentée en vert tandis que les 5 sous-unités B organisées en anneau sont multicolores. Le pont di-sulfure interne à la sous-unité A est en jaune (Fraser et coll., 2004).

observée quand la souche d'EHEC O157:H7 est mise en culture dans un milieu conditionné avec *Bacteroides thetaiotaomicron* (de Sablet T et coll., 2008).

De façon intuitive on peut supposer que les antibiotiques pourraient favoriser la production de toxine par les EHEC et par conséquent avoir un effet négatif sur la santé du patient traité en aggravant ses symptômes. Cependant, il n'a pas été mis en évidence de corrélation claire entre le traitement aux antibiotiques et le développement d'un SHU. Ceci est appuyé par le fait que dans la plupart des cas le traitement antibiotique est administré quand les symptômes hémorragiques apparaissent, ce qui correspond au moment où les EHEC sont déjà éliminées du tractus intestinal, qu'ils ne colonisent que de façon transitoire. Néanmoins, l'utilisation d'antibiotiques pour le traitement des infections par les EHEC reste déconseillée.

Outre les agents endommageant l'ADN, d'autres facteurs peuvent intervenir dans l'activation du système SOS bactérien. En effet, il a été montré que les polyamines, qui sont abondamment présentes dans le tube digestif et aussi produites par *E. coli*, jouent un rôle dans l'expression du gène *recA* chez *E. coli* K12 en absence d'induction du système SOS mais aussi sous l'effet de la MC et d'autres agents inducteurs (Kim IG and Oh TJ, 2000).

En résumé, la régulation de l'expression des gènes *stx* est dépendante de la complexité du milieu intestinal et peut répondre à une multitude de stimuli exercés sur les EHEC aussi bien par l'hôte, les conditions physico-chimiques que le microbiote intestinal.

III-5-3-b. Structure des Stx

Stx1 et Stx2 sont des hétéropolymères de 70 kDa constitués d'une sous-unité A (active) de 33 kDa qui porte l'activité catalytique, et de 5 sous-unités B (Binding) de 7,7 kDa (Fig. 21) nécessaires à la fixation au récepteur Gb3, également appelé CD77 (O'Brien AD and Holmes RK, 1987). Les données cristallographiques montrent que les sous-unités B forment un anneau pentamérique qui encercle une hélice α située à l'extrémité C-terminale de la sous-unité A. Cette région C-terminale de la sous-unité A est essentielle pour l'assemblage de l'holotoxine (Haddad JE and Jackson MP, 1993).

III-5-3-c. Stx1 *versus* Stx2

Stx1 et Stx2 possèdent respectivement 99% et 56% d'homologie avec la toxine de *S. dysenteriae* (O'Brien AD et coll., 1982; Strockbine NA et coll., 1988). Ainsi, si les toxines Stx1 sont neutralisables par des anticorps anti-Stx de *S. dysenteriae*, les toxines Stx2 ne le sont pas (Strockbine NA et coll., 1986).

Bien que le mécanisme d'action et les principales propriétés biochimiques de Stx1 et Stx2 soient similaires, il a été démontré que Stx1 se fixe 2 fois mieux que Stx2 sur Gb3 (Nakajima H et coll., 2001) et que Stx1 est mieux internalisée dans les cellules T84 que Stx2 (Schuller S et coll., 2004). Cependant, des études réalisées *in vitro* sur des cellules endothéliales microvasculaires rénales (Louise CB and Obrig TG, 1995) et *in vivo* sur des modèles animaux (Lindgren SW et coll., 1993; Wadolkowski EA et coll., 1990) indiquent que Stx2 est plus toxique que Stx1. Ces résultats corroborent les études épidémiologiques indiquant que les souches responsables des cas les plus sévères chez l'homme, comme les souches de sérotype O157: H7, possèdent majoritairement la toxine Stx2 (Boerlin P et coll., 1999).

III-5-3-d. Effets des Stx sur l'épithélium intestinal

Les EHEC ne sont pas considérés comme invasifs bien que certaines souches O157:H7 puissent envahir certaines lignées cellulaires (Oelschlaeger TA et coll., 1994) et que quelques souches LEE-négatives O113:H21 soient capables d'envahir des cellules CHO-K1 (Luck SN et coll., 2005). Les EHEC ne sont en revanche jamais retrouvés dans les organes et les ganglions mésentériques et ne provoquent pas de septicémies. Il n'existe pas de preuve directe de la production de toxine Stx2 *in vivo* chez l'homme, cependant la toxicité envers les cellules Vero des fèces de patients atteints de SHU a été démontrée (Brigotti M et coll., 2006). Les toxines Stx sont donc vraisemblablement produites dans la lumière intestinale, il leur est donc nécessaire de traverser la barrière épithéliale afin d'atteindre le tissu endothélial puis la circulation sanguine pour atteindre leurs cellules cibles. Ainsi, les premières cellules au contact de la Stx sont les entérocytes. Or, ces derniers n'expriment pas à leur surface le récepteur spécifique de la toxine Gb3 (Bjork S et coll., 1987; Holgersson J et coll., 1991). L'ensemble de ces données soulève deux questions majeures liées à la pathogenèse des infections par les EHEC : Quel est l'effet des Stx sur les cellules épithéliales et comment les Stx traversent la muqueuse intestinale pour se retrouver dans le sang ?

- **Réponse des entérocytes à la Stx**

Tout d'abord, il semblerait que les toxines Stx aient un impact sur l'intégrité de l'épithélium intestinal. En effet, la présence de toxine à forte concentration (1 µg/ml) induit des changements structuraux de la muqueuse intestinale, en particulier une extrusion des cellules épithéliales. De plus, des observations microscopiques d'iléum de lapins montrent que les Stx de *S. dysenteriae* à forte concentration altèrent l'épithélium et provoquent une nécrose des

cellules épithéliales (Chopra P et coll., 2006). Cependant, l'effet observé pourrait être attribué non pas à un effet direct de la toxine sur l'épithélium mais à une conséquence sur l'épithélium des dommages causés à l'endothélium (Schuller S et coll., 2004). En outre, les concentrations de toxines utilisées lors de ces expériences sont assez élevées et on peut mettre en cause la pertinence de l'utilisation de telles concentrations.

Les Stx sont également capables d'augmenter de façon significative l'adhésion des EHEC O157:H7 aux cellules épithéliales et d'augmenter la colonisation au niveau intestinal chez la souris via une augmentation de nucléoline qui permet un meilleur transport de l'intimine jusqu'à son récepteur Tir (Robinson CM et coll., 2006).

- **La translocation de Stx à travers la muqueuse intestinale**

Trois hypothèses ont été avancées pour expliquer le passage de la Stx de la lumière intestinale vers l'intérieur de l'organisme : la Stx pourrait *i*) passer par les brèches créées par la destruction des cellules de la muqueuse, *ii*) utiliser une voie paracellulaire après altération des jonctions serrées, et/ou *iii*) être transloquée à travers les cellules épithéliales intactes. Des arguments expérimentaux existent en faveur de chacune des trois hypothèses.

Le passage de la Stx à travers la muqueuse endommagée suite à une inflammation/cytotoxicité a été suggéré. Cette théorie repose sur des observations cliniques démontrant que le taux de cytokines pro-inflammatoires est plus élevé chez des enfants développant un SHU aiguë et sévère en comparaison des enfants souffrant de CH ou de SHU modéré (Fitzpatrick MM et coll., 1992). Cependant, des résultats similaires ont été mis en évidence pour la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Murata A et coll., 1998). Par ailleurs, Litalien *et coll.* ont démontré que les ratios IL-6/IL-10 et IL-6/IL-1Ra sont plus importants chez les enfants présentant de sévères dysfonctions rénales par rapport à ceux sans atteinte rénale. Ainsi, ces données suggèrent que la muqueuse enflammée/endommagée par l'infection bactérienne pourrait laisser passer plus de Stx et favoriser le développement du SHU (Litalien C et coll., 1999). Cependant, le taux de cytokines circulantes n'est peut-être pas le reflet de l'état d'inflammation du côlon. De plus, de nombreuses études contradictoires ont été publiées (Proulx F et coll., 1998; Westerholt S et coll., 2000).

L'altération des jonctions serrées induite par les EHEC a été démontrée *in vitro* (Philpott DJ et coll., 1998) et non *in vivo*. En revanche, il a été établi que les EPEC altèrent la fonction barrière de l'épithélium intestinal chez la souris en agissant sur l'occludine de façon dépendante du SSTT (Shifflett DE et coll., 2005). Cette disruption tissulaire pourrait favoriser le passage de la Stx. De plus, des cellules du système immunitaire pourraient faciliter le

passage intercellulaire de la Stx. A ce titre, il a été démontré que la quantité de toxine traversant la barrière intestinale est corrélée avec le nombre de PN traversant la mono couche de cellules épithéliales intestinales *in vitro* (Hurley BP et coll., 2001). L'afflux de ces cellules dans la muqueuse colique, recrutées par l'IL-8, serait donc un facteur favorisant le SHU. Ainsi, il a été montré que Stx1 se fixe aux PN pour être ensuite transportée jusqu'aux organes cibles (te Loo D et coll., 2000); cependant, cette observation a été récemment controversée (Geelen JM et coll., 2007).

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

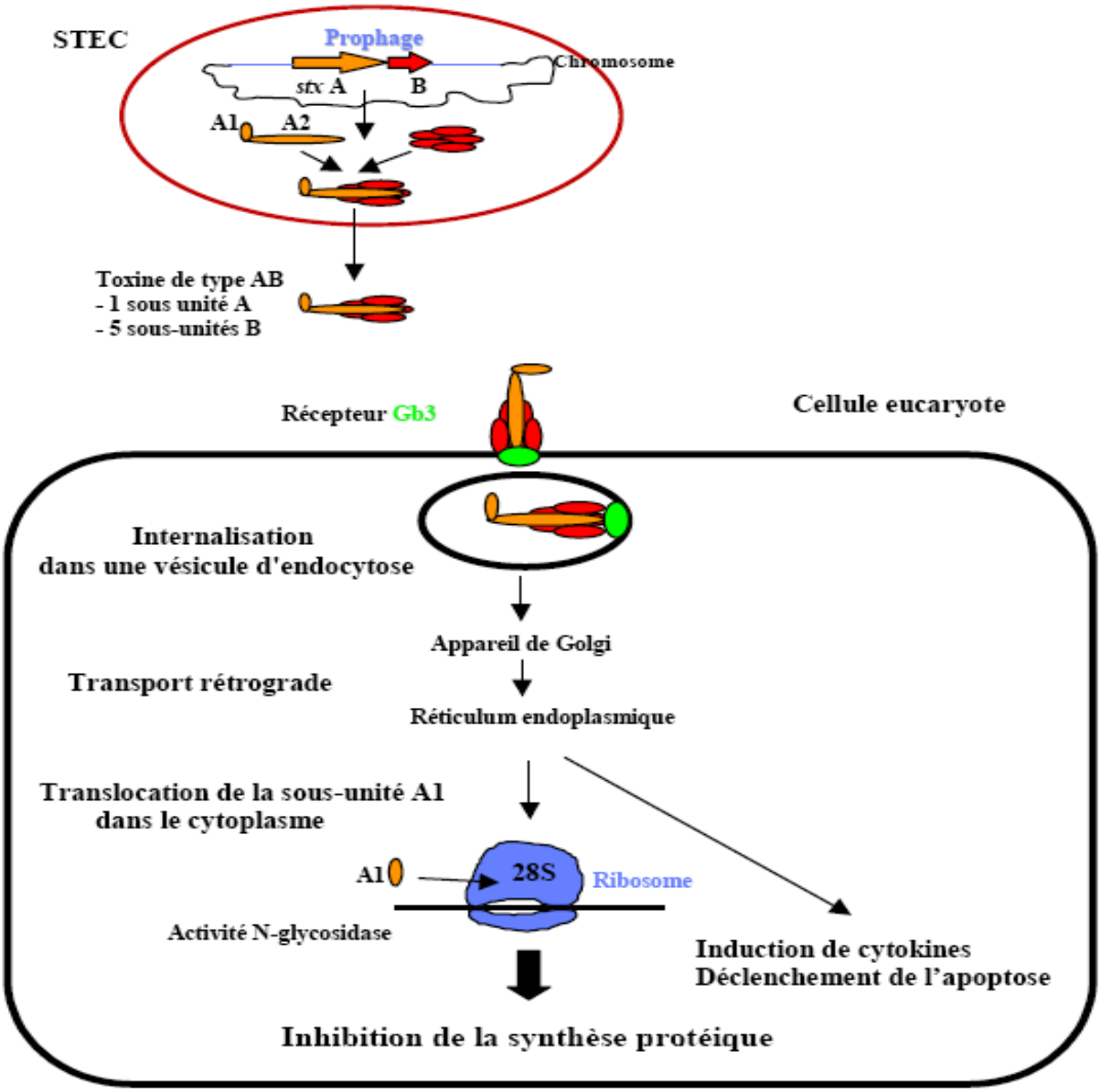
A la lumière de ces résultats, il apparaît difficile de trancher en faveur d'une de ces hypothèses, et ces données mettent à nouveau en exergue la complexité des infections à EHEC. Le mécanisme par lequel les Stx atteignent l'endothélium intestinal est multifactoriel et fait probablement intervenir des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

III-5-3.-e. Action sur l'endothélium

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

La première étape du mécanisme d'action est la fixation à la membrane cytoplasmique de la cellule cible (Fig. 22). Les sous-unités B assemblées en anneau se lient au récepteur Gb3 en reconnaissant le digalactoside terminal [motif Galactose-α (1-4)] (Bast DJ et coll., 1999). Le récepteur et la toxine subissent une endocytose puis un transport rétrograde à travers

Figure 22: Mécanisme d'action des Stx



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

l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique. Lors de ce transport rétrograde, la sous unité A subit un clivage protéolytique dans le réticulum endoplasmique. Il en résulte la libération de deux fragments, A1 et A2 (Garred O et coll., 1995). Le fragment A1 possède une activité N-glycosidase qui agit sur l'ARNr 28S de la sous-unité 60S du ribosome, ce qui conduit à l'excision d'une adénine en position 4324 (Endo Y et coll., 1988). Cette dépurination provoque l'inactivation du ribosome et donc l'arrêt de la synthèse protéique. Ceci conduit à l'apoptose des cellules par l'activation en cascade des caspases 8, 3 et 9 (Kodama T et coll., 1999).

III-5-4. Les autres facteurs de virulence

- **L'entérohémolysine**

L'entérohémolysine ou E-HlyA présente chez certaines souches STEC est codée par le gène *ehxA* présent sur le grand plasmide pO157 (Schmidt H et coll., 1996). On la retrouve dans toutes les souches O157:H7 mais aussi dans certaines souches de sérogroupe O26 ainsi que de sérotypes O113:H21, O91:H21, O103:H2 (données du laboratoire). Elle appartient à la famille des toxines RTX. Son mécanisme d'action est probablement comparable à celui de l'α-hémolysine (Pellett S and Welch RA, 1996). Son activité cytolytique est liée à sa capacité d'insertion dans la membrane et à sa capacité à former des pores engendrant ainsi la lyse osmotique des cellules (Soloaga A et coll., 1999). La délétion du gène codant pour l'hémolysine réduit considérablement la toxicité de ces souches envers des cellules endothéliales en culture. Cette hémolysine apparaît donc comme pouvant à elle seule causer des dommages sur le tissu endothélial (Aldick T et coll., 2007).

- **La sérine protéase EspP**

Ce facteur a été décrit en 1997 ; il s'agit d'une sérine protéase extracellulaire codée par le gène *espP* situé sur le plasmide pO157 capable de cliver le facteur V de coagulation humain (Brunder W et coll., 1997). La production de cette sérine protéase résulterait donc en l'aggravation des colites hémorragiques observées chez les patients. EspP a été retrouvée chez certaines souches O26 mais pas dans les souches O103 (Brunder W et coll., 1997).

- **La toxine CDT**

La toxine CDT (pour cytolethal distending toxin V) est produite par de nombreuses souches O157:H7 et O157:H^{-}, ainsi que par des souches STEC non-O157 (O91:H21, O113:H21)

(Janka A et coll., 2003). Il a été montré que la CDT des STEC a un effet sur une grande variété de lignées de cellules endothéliales ainsi que sur des explants endothéliaux humains. CDT induit de manière dose-dépendante un arrêt du cycle cellulaire en G_2/M ce qui conduit à la distension cellulaire, l'inhibition de la prolifération, et finalement la mort cellulaire (Bielaszewska M et coll., 2005). Il existerait une corrélation positive entre la présence de la toxine CDT et la capacité des souches STEC non-O157 à provoquer des pathologies sévères (Bielaszewska M et coll., 2004).

- **La subtilase**

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

III-6. MODULATION DES RÉPONSES IMMUNES PAR LES EHEC

III-6-1. Etudes chez les patients infectés

Différentes revues indiquent que la leucocytose est un indicateur du développement du SHU induit par *E. coli* O157:H7. Une étude rétrospective sur 278 enfants avec une infection à *E. coli* O157:H7 montre que les patients possédant un fort taux de globules blancs ont 7 fois plus de risque de développer un SHU (Bell BP et coll., 1997). Un rôle possible des leucocytes serait de fixer la Stx sur leur récepteur Gb3 pour la transporter jusqu'aux cellules endothéliales. Ainsi, la Stx a été détectée à la surface de leucocytes circulant chez des patients atteints de SHU et des biopsies de reins ont révélé le recrutement de neutrophiles (Inward CD et coll., 1997; te Loo D et coll., 2000).

Par ailleurs, des études ont montré une augmentation de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, TNF-α) chez des enfants souffrant de SHU en comparaison d'enfants présentant uniquement une colite d'origine bactérienne ou virale. Inversement, certains auteurs ont décrit que les niveaux de ces cytokines ne sont pas modulés chez des enfants infectés en comparaison de patients contrôles. De la même manière, si les concentrations sériques d'IL-10 semblent plus élevées chez les enfants souffrant de SHU par rapport à des enfants souffrant de colite, il a été également publié que le taux d'IL-10 circulant est plus faible chez les enfants infectés par O157:H7 comparativement aux enfants atteints de gastroentérite d'origine bactérienne non EHEC (Murata A et coll., 1998; Westerholt S et coll., 2000).

Ainsi, il a été proposé que l'analyse des rapports des cytokines Th1/Th2 soit un indicateur plus fiable de la susceptibilité aux infections par les EHEC et du développement du SHU. Un déplacement de l'équilibre de la réponse immune vers une réponse de type 1 serait favorable au développement du SHU (Litalien C et coll., 1999; Westerholt S et coll., 2000). Ainsi, une étude rétrospective visant à analyser la réponse de monocytes d'enfants ayant développé ou non un SHU, après stimulation *ex vivo* par le LPS a été réalisée : les ratios IL-1β/IL-10 et TNF-α/IL-10 sont plus élevés chez les enfants ayant développé un SHU que chez les enfants témoins (Westerholt S et coll., 2003).

III-6-2. Modulation de la réponse innée des cellules épithéliales par les EHEC/EPEC

III-6-2-a. Activation de la transduction du signal

Les interactions entre les EHEC et les cellules épithéliales entrainent une altération de nombreuses voies de signalisation. La formation des lésions A/E et le réarrangement du cytosquelette d'actine sont induits notamment par l'activation de la phospholipase C-γ1 et de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K ; Dytoc M et coll., 1994). Les altérations de la barrière intestinale et les diarrhées sont dépendantes de l'activation de la PK-C par les EHEC (Philpott DJ et coll., 1998). En revanche, l'expression des gènes codant pour des facteurs de la réponse immune innée lors de l'infection aux EHEC/EPEC implique d'autres voies de signalisation. En effet, comme pour les pathogènes intracellulaires du genre *Shigella* ou *Salmonella*, NF-κB semble jouer un rôle clé dans l'expression et la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales humaines en réponse aux pathogènes responsables de lésions A/E. Savkovic et coll. ont démontré pour la première fois que les EPEC activent NF-κB dans les cellules T84 entrainant une augmentation de la synthèse d'IL-8 ; de façon intéressante, ces

auteurs ont par ailleurs décrit que ces effets ne sont pas observés lorsque les cellules sont stimulées avec une souche de *E. coli* non pathogène (Savkovic SD et coll., 1997). L'activation de NF-κB en réponse aux EPEC et aux EHEC a part la suite été décrite par de nombreux auteurs (Berin MC et coll., 2002; Malladi V et coll., 2004). D'autre part, il a été décrit que le facteur de transcription AP-1 dans les cellules T84 est induit en réponse à la souche d'EHEC EDL931 (Dahan S et coll., 2002). Cependant, ces auteurs n'ont pas démontré l'implication d'AP-1 dans l'induction de gène pro-inflammatoire en réponse aux EHEC.

Les cascades de signalisation en amont de NF-κB ont également été analysées. Une analyse globale des phosphorylations induites dans les cellules T84 a révélé l'activation de la voie des MAPK (pour mitogen-activated protein kinase) par les EPEC (Czerucka D et coll., 2001) ; en effet, les trois MAPKs : ERK (pour extracellular signal-regulated protein kinase) 1/2, JNK (pour c-jun N-terminal kinase) et p38 sont activées dans les cellules épithéliales en réponse aux EPEC (Czerucka D et coll., 2001). De plus, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des MAPK ou des MAPK kinases dans des co-cultures de cellules épithéliales intestinales humaines et d'EHEC a permis de démontrer que l'activation de NF-κB et que la sécrétion inductible d'IL-8 est dépendante des MAPK (Berin MC et coll., 2002; Dahan S et coll., 2002).

Enfin, il a été montré que les EPEC induisent la translocation et l'activité de PKCζ dans les cellules T84 et Caco-2. PK-Cζ activée augmente l'activité de I-κB kinase qui permet ainsi l'activation de NF-κB et la production d'IL-8 (Savkovic SD et coll., 2003).

III-6-2-b. Implication des facteurs bactériens

- **Le LEE**

Plusieurs études ont clairement établi que les EPEC induisent une réponse immune innée dans les cellules épithéliales intestinales humaines de façon dépendante des gènes du LEE (Czerucka D et coll., 2001; de Grado M et coll., 2001). De la même manière, des souches d'EHEC O157:H7 (LEE^+) mutées pour des gènes codant pour le SSTT induisent moins de production de chimiokines IL-8 et CCL20 par des cellules T84 en comparaison des souches sauvages (Gobert AP et coll., 2008). De façon intéressante, ces auteurs ont par ailleurs décrit que la production de chimiokines en réponse à la souche EDL933 Δ*eae* est plus importante en comparaison de la souche sauvage (Gobert AP et coll., 2008); ce résultat indique que différents gènes du LEE des EHEC peuvent avoir des effets opposés. De façon

complémentaire, deux études ont démontré que certains sérotypes d'EHEC ne possédant pas le LEE (O113:H21, O91:H21) induisent de façon plus importante l'expression d'ARNm de cytokines/chemokines pro-inflammatoires que les bactéries du sérotype O157:H7 (Rogers TJ et coll., 2003; Gobert AP et coll., 2008), suggérant que les souches LEE$^-$ ont développé d'autres stratégies pour induire une réponse inflammatoire ou que le LEE contient des gènes codant pour des facteurs qui inhibent la réponse innée. À ce titre, Hauf et Chakraborty ont montré que NF-κB est induit en réponse à la souche EHEC O26:H$^-$ dans les cellules Hela. La même souche déficiente pour le gène *espB* induit plus longtemps et de façon plus importante l'activation de NF-κB, démontrant que EspB entraîne une inhibition de l'activation de NF-κB (Hauf N and Chakraborty T, 2003).

- **La flagelline**

Les flagelles sont essentiels pour la mobilité et l'adhérence des bactéries mais peuvent également initier des modifications transcriptionnelles dans les cellules eucaryotiques en signalant via TLR-5. Ainsi des flagellines de sérogroupe H6, H7 ou H21 stimulent la production d'IL-8 par des cellules épithéliales (Berin MC et coll., 2002; Rogers TJ et coll., 2003; Zhou X et coll., 2003). De même, des souches d'EHEC déficientes pour le gène *fliC* codant pour les flagellines n'induisent pas la production d'IL-8 (Berin MC et coll., 2002; Rogers TJ et coll., 2003). Plus récemment, il a été décrit que la mutation du gène *fliC* dans des souches d'EHEC O157:H7, O91:H21, O91:H10 et O6:H10 ne modifie pas de façon significative la production de chimiokines par les cellules épithéliales T84 ; en revanche, les ARNm codant pour les chimiokines sont exprimés en grande quantité dans les cellules stimulées par les souches Δ*fliC* complémentées qui produisent beaucoup de flagellines (Gobert AP et coll., 2008).

- **Stx1 et Stx2**

Les toxines Stx ont également un impact sur les voies de signalisation cellulaire dans les cellules épithéliales. Des faibles concentrations (< 100 ng/ml) de Stx1 ou Stx2 induisent l'expression et la production de cytokines et chemokines (TNF-α, IL-8) dans des cellules possédant le récepteur Gb3 comme les cellules Caco-2 (Yamasaki C et coll., 1999) ou les cellules Hct-8 (Thorpe CM et coll., 2001). Dans les cellules Hct-8, Stx1 entraîne l'activation de la voie des MAPK notamment de p38 et JNK. En bloquant l'activation de p38 et JNK induite par Stx1, on observe une diminution de l'apoptose dans les cellules Hct-8 (Thorpe CM

et coll., 2001). Il a été montré que la sous-unité A de Stx1 est impliquée dans l'induction de l'expression de cytokines (Yamasaki C et coll., 1999).

De façon contradictoire, il a été montré que les EHEC O157:H7 induisent l'expression d'IL-8 indépendamment de Stx dans les cellules Caco-2. Rogers et coll. ont montré que la concentration en IL-8 dans des surnageants d'Hct-8 stimulées par 100 ng/ml de flagelline est 100 fois plus élevée que dans le surnageant de cellules stimulées par 100 ng/ml de Stx1 ou Stx2 (Rogers TJ et coll., 2003). D'autre part, l'activation de ERK1/2, p38 et l'expression et la synthèse d'IL-8 est observée à des niveaux identiques lorsque les cellules sont stimulées par la souche 86-24 (EHEC O157:H7) qui possède Stx2 seulement ou par la souche 86-24Δ*stx2* (Berin MC et coll., 2002). De façon complémentaire, les cellules Caco-2 activées avec 10 µg/ml de Stx2 ne produisent pas d'IL-8 ce qui démontre que la synthèse de cytokines n'est pas contrôlée par Stx (Berin MC et coll., 2002). Par ailleurs, il a récemment été démontré que Stx inhibe la transduction du signal dépendant du système PI3K/Akt induite par les EHEC dans des cellules épithéliales humaines n'exprimant pas Gb3. Il en résulte que des cellules épithéliales produisent moins de chimiokines en réponse à des EHEC sauvages par rapport à des bactéries invalidées pour les gènes codant pour Stx1 et Stx2 (Gobert AP et coll., 2007). Ce mécanisme pourrait représenter un mécanisme d'échappement de la réponse immune innée par les EHEC.

LES EHEC/EPEC peuvent activer de nombreuses voies de signalisation aboutissant au développement d'une réponse inflammatoire. Certains auteurs suggèrent que l'intensité de la réponse immune mucosale pourrait être corrélée au développement du SHU. Cependant *i*) les EHEC ont élaborés de nombreuses stratégies pour inhiber la réponse innée des entérocytes et *ii*) de nombreux médiateurs de cette réponse, dont le NO, n'ont pas été étudiés à ce jour.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les données de la littérature démontrent que les EHEC modulent la réponse immune innée des entérocytes humains, les premières cellules au contact des bactéries pathogènes dans le tractus digestif. Cependant, les interactions entre les EHEC et le NO, un élément essentiel du programme de défense inné, n'ont jamais été étudiées.

Nous avons émis l'hypothèse que NO pouvait agir sur la croissance des EHEC et/ou induire des modifications transcriptionnelles ; plus particulièrement, nous avons suggéré que NO pouvait modifier l'expression de gènes codant pour des facteurs de virulence. En retour, les EHEC pourraient moduler l'expression de la iNOS et/ou la production de NO dans les cellules épithéliales intestinales humaines.

Pour vérifier ces hypothèses, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Analyser l'effet du NO produit par des donneurs chimiques de NO et par les cellules épithéliales humaines sur *i*) la croissance et la survie des EHEC, *ii*) la production de Stx, le facteur de virulence des EHEC responsable des symptômes hémorragiques, *iii*) l'expression des gènes par une approche transcriptomique et *iv*) l'adhésion des EHEC aux entérocytes.
- Etudier l'expression du gène codant pour la iNOS dans des cellules épithéliales intestinales humaines en présence ou absence de cytokines pro-inflammatoires et rechercher les mécanismes moléculaires et le facteur bactérien responsables de cette modulation.
- Développer un modèle animal afin d'étudier l'immunité mucosale intestinale, et plus précisément la production de NO, en réponse à l'infection par les EHEC.

CHAPITRE 1

NO EST UN INHIBITEUR DE LA PRODUCTION DE Stx PAR LES EHEC

INTRODUCTION

Chez l'homme, les infections par les EHEC se traduisent généralement par des CH qui peuvent évoluer plus gravement vers des SHU ou PTT. Ces symptômes hémorragiques sont dus à la production de Stx par les EHEC. Les gènes codant les toxines Stx1 et Stx2 sont portés par un phage de type λ intégré dans le génome bactérien et leur expression est induite lorsque la réponse SOS bactérienne se met en place suite à des altérations importantes de l'ADN (Sutton MD et coll., 2000). Les toxines sont alors produites dans la lumière intestinale et traversent la barrière épithéliale. Véhiculée par la circulation sanguine, la Stx se fixe sur le récepteur Gb3 des cellules endothéliales, principalement au niveau du côlon, des reins et du cerveau, entrainant un arrêt de la synthèse protéique et la mort des cellules (Kodama T et coll., 1999). Il existe deux types de Stx : Stx1 et Stx2. Des études réalisées *in vitro* sur des cellules endothéliales rénales ont montré que Stx2 est plus toxique que Stx1 (Louise CB and Obrig TG, 1995).

Le mécanisme de translocation de Stx à travers la muqueuse intestinale est mal connu. Une des hypothèses serait que la Stx pourrait passer par les brèches créées par la destruction des cellules de la muqueuse suite à une inflammation. Cette théorie repose sur des études cliniques montrant que des patients atteints de SHU possèdent un taux élevé de chimiokines et cytokines de type 1 circulantes (Fitzpatrick MM et coll., 1992; Murata A et coll., 1998). Même si aucun lien direct n'a été établi entre l'induction de la réponse immune mucosale et le développement des pathologies hémorragiques, on suppose que l'inflammation de la muqueuse intestinale pourrait favoriser le passage de la toxine Stx dans le sang et ainsi participer au développement du SHU/PTT.

D'autres effecteurs du programme de défense non spécifique peuvent être produits par la muqueuse intestinale en contact avec des bactéries pathogènes, incluant le NO (Gobert AP et coll., 2004). Le NO possède de nombreuses propriétés physiologiques, notamment des propriétés immunologiques. Les données présentes dans la littérature suggèrent que NO peut être cytotoxique pour les bactéries pathogènes (Gobert AP et coll., 2004) et peut induire des modifications transcriptionnelles en interagissant avec des senseurs de NO (Rodionov DA et coll., 2005). Pour se protéger des effets délétères du NO, la réponse SOS semble être essentielle pour les bactéries. Ainsi, des études ont montré que la délétion du gène *recA*

conduit à une augmentation de la sensibilité au NO, suggérant que la réponse SOS est induite en réponse au NO (Spek EJ et coll., 2001).

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que NO pourrait induire un stress nitrosant et serait donc un inducteur de la réponse SOS des EHEC, augmentant ainsi la production de Stx. Pour tester ce postulat, nous avons étudié l'effet de donneurs de NO sur la croissance des EHEC, l'activation de la réponse SOS, l'expression des gènes *stx1* et *stx2* et la production de toxine dans les cultures de bactéries. Enfin, à travers un modèle de co-cultures cellules épithéliales intestinales humaines/EHEC, nous avons analysé l'effet d'une source cellulaire de NO sur la synthèse de Stx.

Tableau 1: Caractéristiques phénotypiques des souches EDL933 et 86-24

Souches	Origine	Sérotype	LEE	*stx1*	*stx2*	Source
EDL933	CH/E	O157:H7	+	+	+	STEC Center
8624	CH/E	O157:H7	+	-	+	STEC Center

CH, colites hémorragiques; E, épidémie.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. PRODUCTION ET DÉTECTION DE NO

I-1. Donneurs et chélateurs de NO

Trois donneurs chimiques de NO, DEA-NONOate (2-(N,N-diéthylamino)-diazénolate-2-oxide), NOR-3 ((±)-(E)-éthyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-3-hexènéamide) et NOR-4 ((±)-(E)-éthyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-3-hexènecarbamoylpyridine) dont les demi-vies en PBS, pH 7,4 ; à 37°C sont respectivement de 2, 30 et 60 min ont été utilisés. Le 2-(4-carboxyphényl)-4,4,5,5-tétraméthylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) et l'Hb ont été utilisés comme chélateur de NO. Tous ces réactifs ont été obtenus chez Alexis Biochemicals.

I-2. Quantification de [NOx]

En milieu aérobie, NO est rapidement oxydé et forme NO_3^- et NO_2^-. Le dosage de ces dérivés nitrés a été réalisé à l'aide du kit 'Nitrite/Nitrate Assay Kit' (Sigma). Ce kit est basé sur le principe suivant : *i*) réduction des ions NO_3^- en NO_2^- par une nitrate réductase ; *ii*) détection chimique de NO_2^- par la méthode colorimétrique de Griess. Une courbe standard réalisée avec du $NaNO_3$ nous a permis de quantifier la concentration en NO_3^-.

La réaction de Griess a été utilisée pour doser [NO_2^-] dans les milieux ; la courbe étalon a été réalisée à partir de différentes concentrations de $NaNO_2$.

II. LES EHEC

II-1. Souches et conditions de culture

Les souches EDL933 et 86-24 appartiennent au sérotype O157:H7. EDL933 est la souche de référence des EHEC O157:H7 isolée à partir de viande lors d'une épidémie en 1982 aux USA (O'Brien AD et coll., 1983). La souche 86-24 a été isolée chez des patients atteints de CH lors d'une épidémie (Donnenberg MS et coll., 1993). Ces souches ont été obtenues auprès du National Food Safety and Toxicology Center, Michigan State University, East Lansing, MI (STEC center: http://shigatox.net) et possèdent les caractéristiques génotypiques présentées sur le Tableau 1.

Les bactéries provenant d'un stock en glycérol 20% conservé à -20°C ont été cultivées pendant 1 nuit à 37°C sous agitation en milieu Luria Bertani (MLB), avec ou sans antibiotiques de sélection des souches mutantes et complémentées (kanamycine, 50 µg/ml et/ou ampicilline, 50 µg/ml). À partir de cette pré-culture, 10 ml de MLB ont été ensemencés ($DO_{600\ nm}$ = 0,03) en présence ou absence de donneurs et/ou de chélateurs de NO. La mitomycine C (MC ; 200 ng/ml), un agent alkylant reconnu pour induire une réponse SOS et la production de Stx (Ritchie JM et coll., 2003), a été éventuellement ajoutée en milieu de phase exponentielle de croissance ($DO_{600\ nm} \approx 0,3$).

À différents temps d'incubation, 2 ml de culture ont été prélevés et centrifugés 10 min à 12000 g. Les surnageants ont été récupérés et filtrés (0,2 µm) pour analyser la concentration en Stx1 et Stx2. Les culots bactériens ont été resuspendus dans 750 µl de TRIzol (Molecular Research) pour l'extraction des ARNm. Enfin, l'analyse de la croissance des EHEC a été réalisée par mesure de la $DO_{600\ nm}$.

II-2. Construction de mutants

Les mutants EDL933 Δ*norR* et EDL933 Δ*nsrR* ont été obtenus par la méthode de Datsenko et Wanner (Datsenko KA and Wanner BL, 2000). Une cassette portant le gène de résistance à la kanamycine a été amplifiée dans la souche *E. coli* CH158 au moyen d'amorces (MtnsrR et MtnorR ; Tableau 2) qui contiennent dans leur région 5' 50 pb correspondant à la séquence du gène à muter. Le produit d'amplification a été purifié sur colonne QiaQuick (Qiagen) et introduit par électroporation dans la souche EDL933 possédant un plasmide pKobeg portant un gène codant pour une recombinase sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'arabinose. Après culture en présence de 1 mM d'arabinose, les recombinases ont permis une recombinaison homologue entre la cassette kanamycine et le gène à supprimer. Les bactéries obtenues ont été criblées sur boîte MLB + kanamycine et les plasmides thermo-sensibles ont été éliminés par culture à 42°C pendant 1 nuit. La présence de la mutation (remplacement du gène d'intérêt par le gène de résistance à la kanamycine) a été vérifiée par PCR et séquençage.

Pour réaliser la complémentation, les gènes *norR* et *nsrR* ont été amplifiés à partir de l'ADN génomique d'EDL933 à l'aide d'amorces spécifiques possédant *i*) des séquences correspondant aux nucléotides du début et de la fin des gènes *norR* et *nsrR* et *ii*) des séquences reconnues par les enzymes de restriction EcoRI et BamHI (CmnsrR et CmnorR ; Tableau 2). Les produits de PCR ont été purifiés et digérés par les enzymes EcoRI et BamHI puis ligués dans le vecteur pTrc99A qui est sous le contrôle du promoteur *trc* inductible à

l'isopropyl β-D-thiogalactoside et qui confère la résistance à l'ampicilline. Ces plasmides ont été introduits dans les souches mutantes par électroporation.

III. CULTURES DE CELLULES ET INFECTIONS

Les cellules épithéliales intestinales humaines Hct-8 ont été maintenues en culture à 37°C et en atmosphère à 5% de CO_2 dans un milieu DMEM-Glutamax-High Glucose enrichi de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, 10% d'HEPES, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les cellules ont été mises en plaque de 6 puits (10^6 cellules/puits) et cultivées pendant 5-7 jours jusqu'à confluence ; à ce stade, le nombre de cellules a été estimé à 3 x 10^6 cellules/puits. Les cellules confluentes ont été stimulées ou non pendant 24 h avec un cocktail de cytokines composé d'IFN-γ (50 ng/ml), de TNF-α (20 ng/ml) et d'IL-1β (5 ng/ml) ; ces cytokines sont reconnues pour induire l'expression de la iNOS dans les cellules épithéliales intestinales humaines (Kolios G et coll., 1995; Marion R et coll., 2003). Les cellules ont été lavées et les bactéries en phase exponentielle de croissance ($DO_{600\ nm} \approx 0,3$) ont été ajoutées à une multiplicité d'infection (MOI) de 10, dans un milieu sans antibiotiques, en présence ou absence de L-NIL (1 mM), un inhibiteur de la iNOS, et/ou de MC (200 ng/ml).

Aux temps indiqués, la suspension bactérienne a été centrifugée à 12000 g pendant 10 min. Le culot bactérien a été repris dans 750 µl de TRIzol pour extraire l'ARN.

IV. QUANTIFICATION DES ARNm

IV-1. Extraction des ARN totaux

Les ARN ont été extraits par la méthode d'extraction au TRIzol. Brièvement, les bactéries ont été lysées dans le TRIzol pendant 10 min à température ambiante. Après ajout de chloroforme, les échantillons ont été centrifugés à 12000 g à 4 °C pendant 15 min. La partie aqueuse supérieure a été prélevée et les ARN solubles ont été précipités par de l'isopropanol. Enfin, après un lavage à l'éthanol 75%, les ARN ont été solubilisés dans de l'eau DEPC pendant 10 min à 56 °C. La concentration et la pureté des ARNm ont été analysées par spectrophotométrie (260 et 280 nm) et/ou par Nanodrop ND-1000 spectrophotomètre (Nanodrop Technologies). Afin d'éliminer les traces d'ADN génomique, un traitement à la Dnase I (Fermentas) pendant 30 min à 37°C a été réalisé.

Tableau 2: Liste des oligonucléotides

Amorces	Séquences (5'-3')
MtnsrR-F	GTGCAGTTAACGAGTTTCACTGATTACGGATTACGTGCGCTGACTACATAGCCACGTTGTGTCTAAAATC
MtnsrR-R	GCAAGCGTGTAGTTATCCAGTTCCGTAAGAAAACTTTGCACGGCCTTAGATTAGAAAAACTCATCGAGCA
MtnorR-F	CAGTTTTTTATCTGATTGTTTTTACTCTATAAATAAAATTATGCTCATTAAGCCACGTTGTGTCTCAAAATC
MtnorR-R	AAACTCACCGGCGCAATAAACCTGCAGGATTTCTATCAGGCCGGGATTATTTAGAAAAACTCATCGAGCA
CmnsrR-Eco	CGGGAATTGTGCAGTTAACGAGTTTCACT
CmnsrR-Bam	CGGGATCCTCACTCCACCAGCAATAATTT
CmnorR-Eco	CGGGAATTATGAGTAGTCAAAATGAC
CmnorR-Bam	CGGGATCCTTAATCCTTCAATCCCAG
Estx1-F	TGTTGCAGGGATCAGTCGTA
Estx1-R	TGAGGTTCCACTATGCGACA
Estx2-F	CACATTACAGTGAAGGTTGA
Estx2-R	TTCAGCAAATCCGGAGCCTG
EtufA-F	TGGTTGATGACGAAGAGCTG
EtufA-R	GCTCTGGTTCCGGAATGTAA
EfliC-F	GAAACCATCACGATCGACCT
EfliC-R	GCGCCAGCAGAAGTTAAATC
ErecA-F	GGTAAAACCACGCTGACGTT
ErecA-R	ATATCGACGCCCAGTTTACG
EhmpA-F	TCCCTTTACTGGTGGAAACG
EhmpA-R	ATCGCCATTACGCTGGTTAC
EnorV-F	TATCCGGGACTTCACTCCAC
EnorV-R	AGAAGAAACCTCTGCCACCA
EvacB-F	CAATTGCAGCATCTCTTCCA
EvacB-R	ACCGCGCCATTAAGTATCTG
Sstx1-F	CAGAGGAAGGGCGGTTTAAT
Sstx1-R	GCCGGACACATAGAAGGAAA
Sstx2-F	TATATCAGTGCCCGGTGTGA
Sstx2-R	CATTATTAAACTGCACTTCAGC
SrecA-F	TACCGGTTCGCTTTCACTGG
SrecA-R	CGCCTTCGCTATCATCTACA
StufA-F	CAGGTAGGCGTTCCGTTACAT
StufA-R	GTGCAAAAAGGGCATCAAAT

IV-2. Transcription inverse des ARN

Les ARN (2 µg) ont été rétro-transcrits en utilisant 30 ng/µl d'amorces aléatoires (Random Primers), 0,5 mM de chaque dNTP, 10 mM de DTT et 5 U/µl de SuperScript II Reverse Transcriptase. La réaction s'est déroulée pendant 50 min à 42 °C puis l'enzyme a été inactivée à 70 °C pendant 15 min. Tous les réactifs nécessaires à la transcription inverse ont été obtenus chez Invitrogen.

IV-3. PCR quantitative

L'analyse de l'expression des gènes *stx1*, *stx2* et *recA* a été réalisée par PCR quantitative. Le gène *tufA*, qui code pour le facteur d'élongation de la traduction EF-Tu, a été utilisé comme gène de référence (Young FS and Furano AV, 1981).

IV-3-1. Obtention des courbes standards

Une séquence des gènes *stx2*, *stx1*, *recA* et *tufA* a été amplifiée à partir d'ADN génomique de la souche EDL933 en utilisant 0,25 U de l'ADN polymérase AccuTaq (Sigma) et les amorces Sstx1, Sstx2, SrecA ou StufA (Tableau 2). Les produits de PCR ont été purifiés sur colonne Strataprep (Stratagene) puis quantifiés par mesure de la DO à 260 nm afin d'obtenir le nombre de molécules d'ADN/µl (N = [$6{,}01.10^{23}$ x [ADN] (g/µl)]/ [660 (ADN double brin) x taille de l'amplicon (pb)]). Les produits d'amplification ont été ensuite dilués dans les volumes d'eau appropriés pour obtenir une solution mère à 5.10^9 molécules d'ADN/µl. À partir de cette solution mère, des dilutions décimales sériées ont été réalisées pour obtenir une gamme de dilutions comprises entre 5 et 5.10^8 molécules/µl. Ces séries de dilutions ont été utilisées comme matrices pour les PCR afin d'obtenir des courbes standards.

IV-3-2. La PCR en temps réel

Les PCR en temps réel ont été effectuées sur les ADNc (2 µl) et sur les séries de dilution des courbes standards (2 µl) avec 0,5 µM des amorces Estx1, Estx2, ErecA ou EtufA et le kit LightCycler Faststart DNA Master SYBR green I (Roche) dans l'appareil LightCycler (Roche). Il est important de noter que les amorces Estx1, Estx2, ErecA ou EtufA ont été créées à l'intérieur des séquences définies par les amorces Sstx1, Sstx2, SrecA ou StufA (Tableau 2). Chaque échantillon a été analysé en duplicat. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel LightCycler Data Analysis. Pour les courbes standards, nous avons choisi de

ne garder que les dilutions pour lesquelles l'efficacité de la PCR était supérieure ou égale à 95% et l'erreur expérimentale inférieure à 10%.

Les niveaux d'expression des gènes *stx1*, *stx2*, *recA* et *tufA* ont donc été quantifiés en comparant le nombre de cycles nécessaires pour obtenir une fluorescence donnée à celui obtenu sur la courbe standard correspondante ; les valeurs obtenues sont exprimées en nombre de copies/ng de cDNA. Les résultats sont présentés comme le ratio du nombre de copies des gènes *stx1*, *stx2* ou *recA* par rapport au nombre de copies du gène de ménage *tufA*.

IV-4. PCR semi-quantitative

L'expression des gènes *fliC, hmpA, vacB* et *norV* a été analysée par PCR semi-quantitative. Une PCR en temps réel a été effectuée dans les mêmes conditions que ci-dessus avec 0,5 µM des amorces EfliC, EhmpA, EnorV, EvacB ou EtufA (Tableau 2). Les niveaux d'expression des ARNm des gènes cibles ont été normalisés par rapport au contrôle interne *tufA* et par rapport à une condition basale (souche EDL933 cultivée seule) en utilisant la méthode comparative du seuil de fluorescence. Les résultats sont alors présentés en tant qu'expression relative du gène cible par rapport à son expression dans la souche EDL933.

V. QUANTIFICATION DES PHAGES stx2

Les phages qui contiennent le gène *stx2* dans la souche EDL933 sont appelés BP-933W. La quantification des particules phagiques a été réalisée en deux temps : *i*) purification des phages et *ii*) quantification par PCR quantitative.

Six ml de culture ont été centrifugés à 12000 g pendant 10 min et le surnageant a été filtré (0,45 µm) puis traité par 10 µg/ml de RNase A (Amersham Biosciences) et 40 U/ml de DNase I (Amersham Biosciences) pendant 30 min à 37°C pour éliminer toute trace d'acides nucléiques non phagiques. Les phages ont été ensuite sédimentés par ultracentrifugation à 76000 g pendant 16 h à 4°C. Le culot a été repris dans 100 µl de PBS et les phages ont été visualisés par microscopie électronique à balayage (Hitachi H-7650).

Les suspensions phagiques ont été bouillies à 95°C pendant 5 min afin de libérer l'ADN phagique. Ces dernières (1 µl) ont été utilisées comme matrice pour la PCR quantitative dans les mêmes conditions que celles décrites pour quantifier les ARNm de *stx2* et de *tufA*. Par ailleurs, une PCR classique a été réalisée avec 5 µl de suspension phagique, les amorces Estx2 et 0,5 U d'ADN polymérase AccuTaq (Sigma). Un cycle de PCR a été le suivant : 94°C

pendant 30 s, 51°C pendant 30 s et 68°C pendant 30 s. Trente cycles ont été réalisés et suivis d'une étape d'élongation de 7 min à 68°C.

Nous n'avons pas détecté de produit d'amplification du gène *tufA* par PCR et PCR quantitative dans les suspensions phagiques. Ce résultat démontre l'absence d'ADN bactérien dans les lysats de phages.

VI. DOSAGE DES STX

Le dosage des toxines Stx1 et Stx2 a été réalisé par la technique ELISA (pour enzyme-linked immuno-sorbent assay). Un Ac monoclonal dirigé contre la sous-unité B de la toxine Stx2 (STX2-BB12 ; Toxin Technology) ou un Ac monoclonal dirigé contre la sous-unité B de la toxine Stx1 (STX1-9C9; Toxin Technology) a été adsorbée sur plaque de 96 puits Maxisorp (Nunc) pendant une nuit à 4°C ; ces Ac ont été utilisés au 1/500 dans un tampon carbonate/bicarbonate. Après élimination du tampon carbonate/bicarbonate, les plaques ont été saturées par une solution de saturation (200 µl par puits) pendant 30 min à 37°C.

Pendant ce temps, des dilutions sériées au ½ des échantillons ont été effectuées dans un tampon de dilution. Une gamme de dilution des toxines Stx1 ou Stx2 purifiée (Toxin Technology) a été réalisée pour obtenir une courbe étalon.

Après la saturation, la plaque Maxisorp a été lavée 3 fois avec un tampon de lavage. La gamme standard et les échantillons ont été déposés en duplicat à raison de 100 µl par puits. La plaque a été incubée pendant 2 h à 37 °C et lavée 3 fois. Un Ac polyclonal anti-Stx1 ou anti-Stx2 de lapin, obtenu dans notre laboratoire, dilué au 1/2000 a été déposé sur la plaque (100 µl par puits) pendant 1 h 30 à 37 °C. Après 3 lavages un Ac de chèvre anti-Ig de lapin couplé à la peroxydase (Pierce) a été déposé (1/10000 ; 100 µl/puits) sur les plaques pendant 45 minutes à 37 °C.

La révélation a été réalisée en utilisant le kit Stable Peroxydase Substrate (Pierce) et 0,2 mg/ml d'orthophénylène diamine (Sigma). La coloration a été arrêtée par ajout de 50 µl/puits de H_2SO_4 2N. La DO à 492 nm a été ensuite analysée dans le lecteur de plaques µQuant (Biotek). La concentration en toxine des échantillons a été calculée en utilisant l'équation de la courbe standard.

VII. WESTERN-BLOT

La présence de flagelline H7 dans les bactéries a été analysée par Western-blot. Les échantillons protéiques ont été obtenus à partir de surnageants bactériens après une culture de 24 h puis dosés par la méthode de Bradford. Les échantillons (70 µg) ont été dénaturés par un choc thermique puis déposés sur un gel SDS-PAGE 10%. Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose sous l'action d'un champ électrique. La membrane a ensuite été saturée par une solution de PBS-lait écrémé 5%-Tween 0,1% et hybridée pendant une nuit à 4°C avec un Ac polyclonal dirigé contre la flagelline H7 (1/500 ; Difco). Après 3 lavages en PBS-Tween 0,5%, la membrane est incubée avec un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (1/5000 ; Pierce) pendant 1 h à température ambiante. La détection a été réalisée par chimioluminescence par le kit ECL Western Blotting Substrate (Pierce) et révélée sur film Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare).

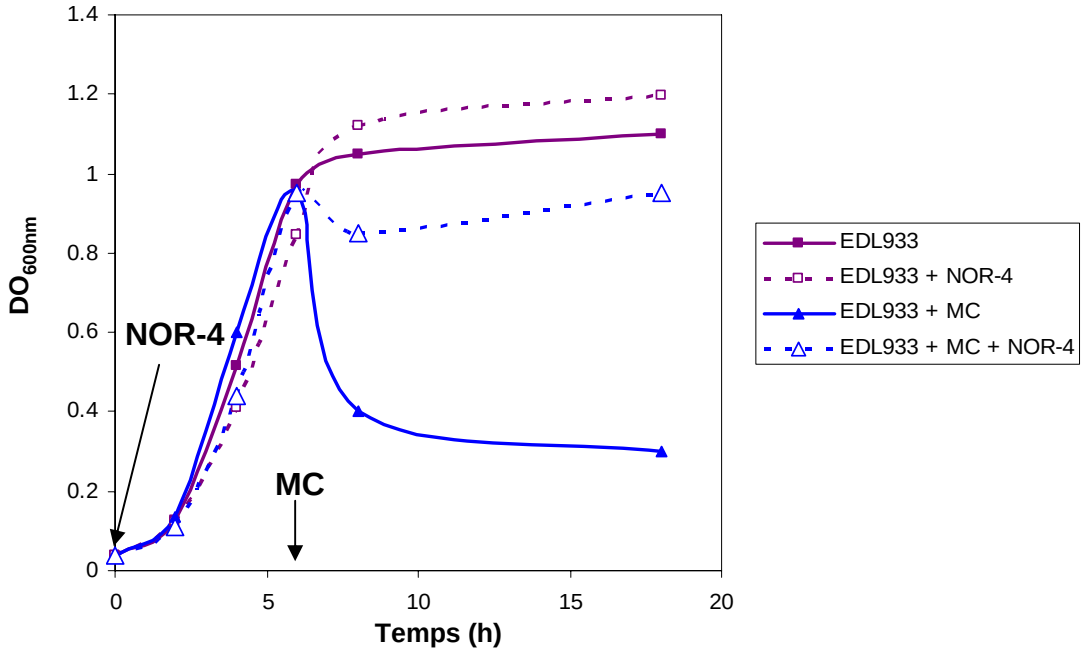
VIII. MESURE DE LA CYTOTOXICITÉ

Les cellules Hct-8 ont été cultivées en plaque de 24 puits puis traitées avec les cytokines et infectées avec EDL933 pendant 6 h. À la fin de l'incubation, les cellules ont été lavées puis incubées dans une solution de cristal violet (0,05% dans l'éthanol à 20%) pendant 15 min. Le colorant extracellulaire a été éliminé par des lavages à l'eau distillée. Le colorant fixé aux cellules a été élué par une solution 0,1% acide acétique/50% éthanol. L'absorbance a été lue à 585 nm. La cytotoxicité maximale est mesurée après l'ajout de 2 g/l de Triton X-100 sur les cellules non traitées (95 ± 5% de toxicité, n = 4).

IX. ANALYSES STATISTIQUES

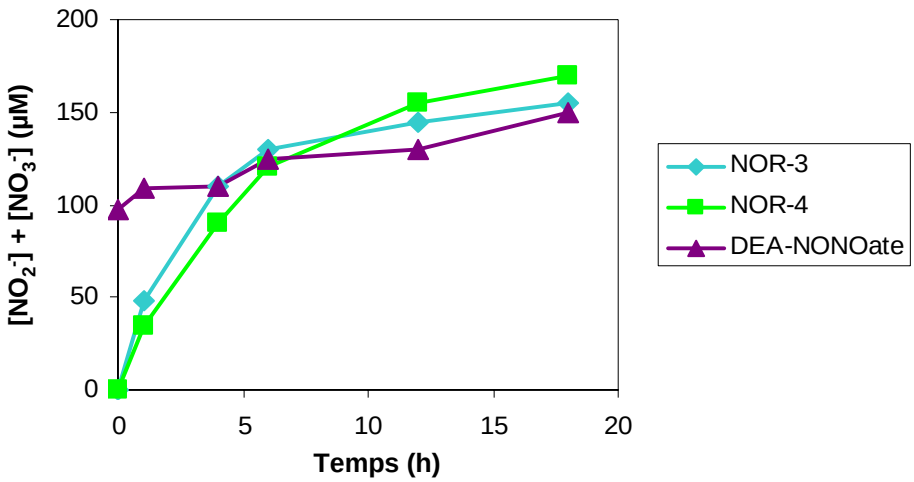
Les données obtenues sont présentées en tant que moyenne ± erreur standard à la moyenne. Cette dernière est obtenue en faisant le rapport de l'écart type sur la racine carré du nombre d'expérimentation (n). L'analyse statistique a été réalisée par un test *t* de Student quand seulement 2 groupes ont été comparés ; les échantillons ont été considérés comme non appariés. Une analyse de variance avec le test de Student-Newman-Keuls bilatéral a été utilisée pour analyser les différences statistiques lorsque plus de 2 groupes ont été comparés.

Figure 1: Effet de la MC et de NO sur la croissance de EDL933



La souche EDL933 a été cultivée en MLB avec 200 µM de NOR-4 et/ou 200 ng/ml de MC. La DO_{600nm} a été mesurée aux temps indiqués. Cette figure est la représentation de trois expériences indépendantes.

Figure 2: Cinétique de libération du NO par NOR-3, NOR-4 et DEA-NONOate



Les concentrations en NO_2^- et NO_3^- ont été déterminées en MLB contenant 200 µM NOR-3, NOR-4 et DEA-NONOate.

RÉSULTATS

I. EFFET DU NO SUR LA CROISSANCE ET LA SURVIE DES EHEC

Pour analyser l'effet du NO sur la croissance d'EDL933, les cultures bactériennes ont été traitées dans un premier temps avec le donneur de NO NOR-4, en présence ou absence de MC.

La présence de NOR-4 (de 50 à 500 µM) dans les cultures n'a pas modifié la croissance de la souche EDL933 ni sa survie à 24 h (résultat montré pour [NOR-4] de 200 µM ; Fig. 1), malgré une production continue de NO pendant environ 6 h (Fig. 2). En revanche, lorsque la MC a été ajoutée 6 h après le début de la culture, nous avons observé une diminution de la croissance continue dès 1 h après addition de l'antibiotique. De façon importante, cet effet bactériotoxique de la MC n'a pas été constaté lorsque les bactéries ont été préalablement traitées par 200 à 500 µM de NOR-4 (résultat montré pour [NOR-4] de 200 µM ; Fig. 1). Nous avons donc choisi de continuer à travailler avec une concentration de NOR-4 de 200 µM.

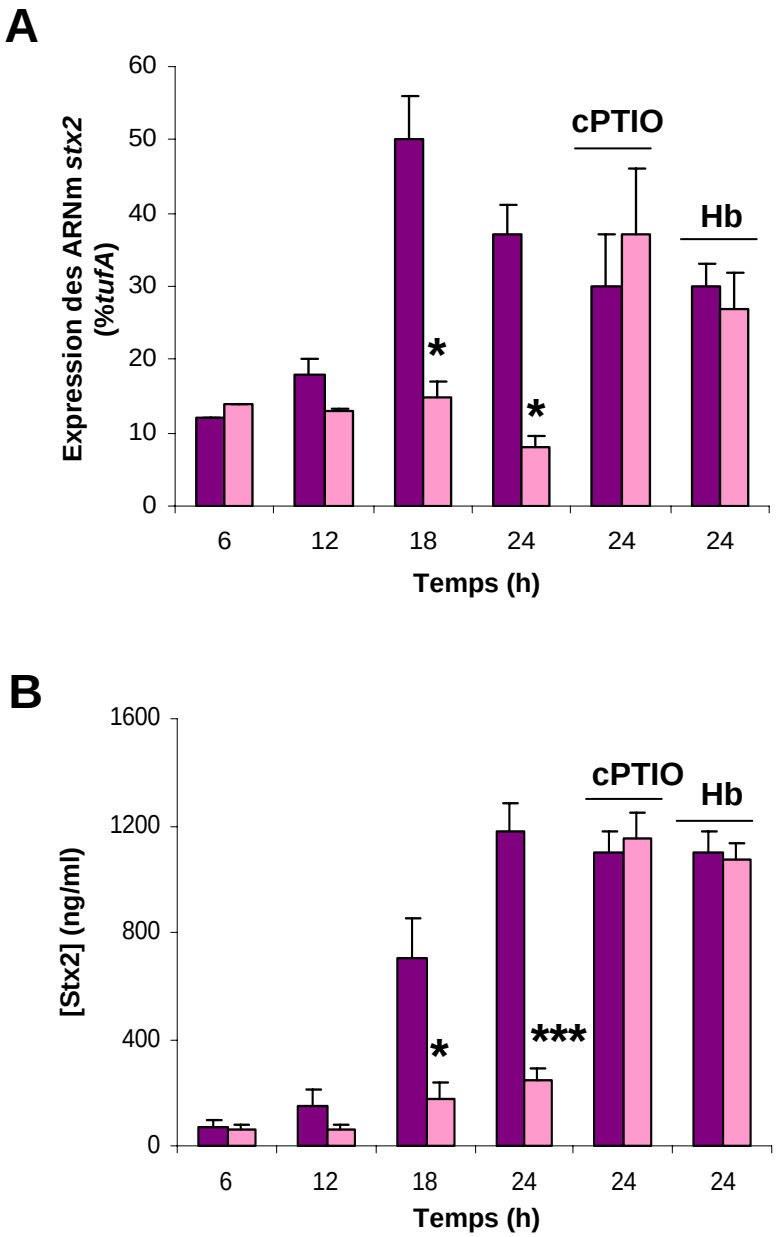
Des résultats identiques ont été obtenus lorsque NOR-3 (200 µM) a été utilisé : NOR-3 n'a pas modifié la croissance d'EDL933. En présence de NOR-3 + MC, nous n'avons pas observé d'effet toxique de la MC. En revanche, le DEA-NONOate qui libère NO en quelques minutes (Fig. 2) n'a pas permis la protection d'EDL933 contre l'effet lytique de la MC (résultats non montrés).

II. NO EST UN INHIBITEUR DE L'EXPRESSION DU GÈNE *stx2*

II-1. Inhibition de la production spontanée de Stx2 par NO

Nous avons ensuite recherché l'effet du NO sur l'expression du gène *stx2* et sur la production de Stx2. Nous avons tout d'abord constaté que la quantité d'ARNm du gène *stx2* est maximale en phase stationnaire (Fig. 3A). De façon inattendue et contraire à notre hypothèse de départ, l'accumulation des ARNm *stx2* a été diminuée significativement 18 h et 24 h après le début de la culture, en présence de 200 µM de NOR-4, (Fig. 3A) en comparaison des bactéries sans traitement par NO. Par ailleurs, l'ajout de cPTIO (250 µM) ou d'Hb (200 µM)

Figure 3: NOR-4 inhibe la production spontanée de Stx2 par EDL933



La souche EDL933 (10^6 bactéries/ml) a été cultivée en présence (barres roses) ou en absence (barres violettes) de NOR-4, avec ou sans cPTIO ou Hb. Le niveau d'ARNm *stx2* dans les bactéries (A) et la concentration Stx2 dans les surnageants de culture (B) ont été respectivement déterminés par RT-qPCR et par ELISA. *, $P<0,05$; ***, $P<0,001$ *vs*. EDL933; n = 3-7.

aux EHEC cultivés en présence de NOR-4 a restauré l'expression de *stx2*, démontrant que la chélation de NO supprime son effet inhibiteur sur la transcription du gène *stx2*.

L'ensemble de ces résultats a été confirmé par le dosage de Stx2 dans les surnageants de cultures bactériennes. Une accumulation de la toxine a été observée au cours du temps dans le surnageant de la souche EDL933 (Fig. 3B). Néanmoins, la synthèse de Stx2 a été fortement inhibée par l'utilisation de NOR-4 dans les cultures (Fig. 3B). Cette activité inhibitrice de NO n'a pas été observée en présence de cPTIO ou d'Hb (Fig. 3B).

Nous n'avons pas détecté l'expression du gène *stx1* ni la production de Stx1 dans les cultures de la souche EDL933, avec ou sans NOR-4 (résultats non montrés).

II-2. NO empêche la production inductible de Stx2

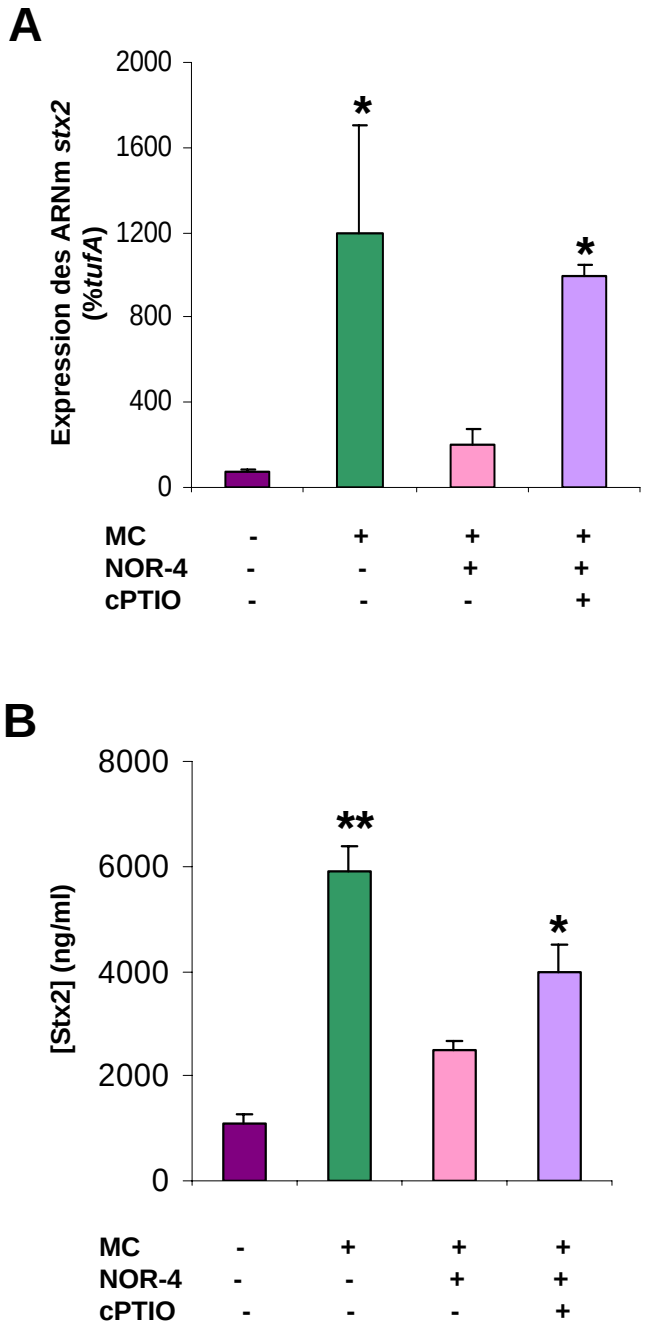
La production maximale de toxine est observée lorsque les bactéries développent une réponse SOS lors d'une agression externe. Nous avons donc traité la souche EDL933 avec la MC afin d'induire l'expression du gène *stx2*. Comme attendu et indiqué sur les Fig. 4A et B, la MC a fortement induit l'expression du gène *stx2* et la production de Stx2.

Quand NOR-4 a été ajouté en même temps que la MC aux bactéries, nous n'avons pas observé de modulation de l'expression de *stx2* ni de la production de Stx2 (résultats non montrés). Nous avons donc essayé de traiter les bactéries par 200 µM de NO pendant 3-6 h avant d'ajouter l'antibiotique. Ainsi, l'expression des ARNm *stx2* et la production de Stx2 ont été significativement et respectivement inhibées de 6,4 ± 1,7 et 2,5 ± 0,9 fois par rapport à EDL933 + MC (Fig. 4A et B). Cette inhibition a été partiellement mais significativement restaurée par l'ajout de cPTIO aux cultures d'EDL933 traitées avec NOR-4 (Fig. 4A et B). L'effet maximal du NO a été observé quand la MC a été ajoutée 6 h après NOR-4.

Nous avons également étudié l'expression et la production de Stx1. Nous avons observé que la production de Stx1 et l'expression du gène *stx1* sont moins élevées que celles de Stx2 : la production de Stx1 dans la souche EDL933 à 24 h a été de 13 ± 2 ng/ml. De plus, l'expression des ARNm *stx1* et la synthèse Stx1 n'ont pas été induites par la MC et n'ont pas été modulées de façon significative par NOR-4 (résultats non montrés).

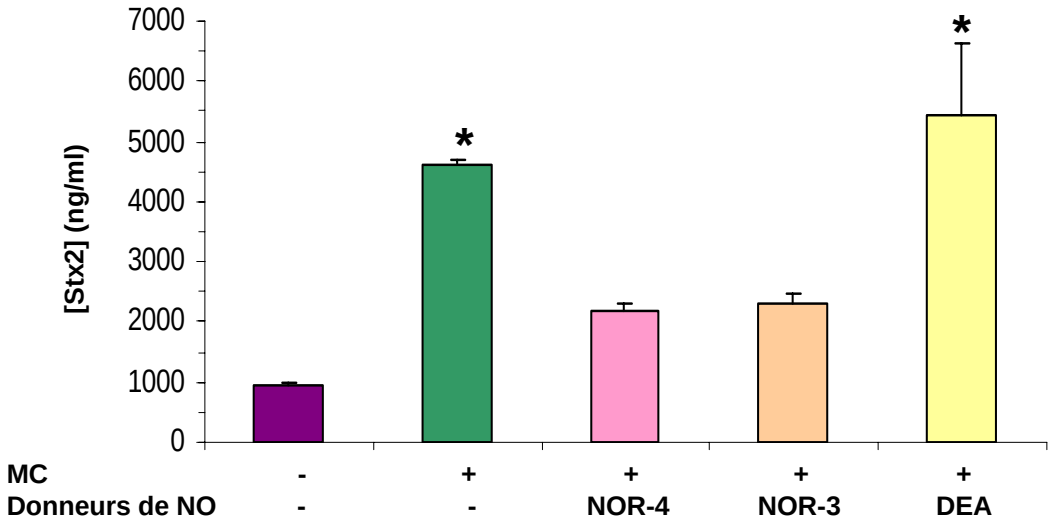
Par ailleurs, des résultats identiques ont été obtenus avec la souche 86-24 (O157:H7) qui ne possède que le gène *stx2* : $[Stx2]_{24\ h}$ = 920 ± 200 ng/ml, 4500 ± 300 ng/ml et 410 ± 150 ng/ml lorsque la souche 86-24 a été respectivement cultivée seule, en présence de MC et avec MC + NOR-4.

Figure 4: NOR-4 inhibe la synthèse de Stx2 induite par la MC



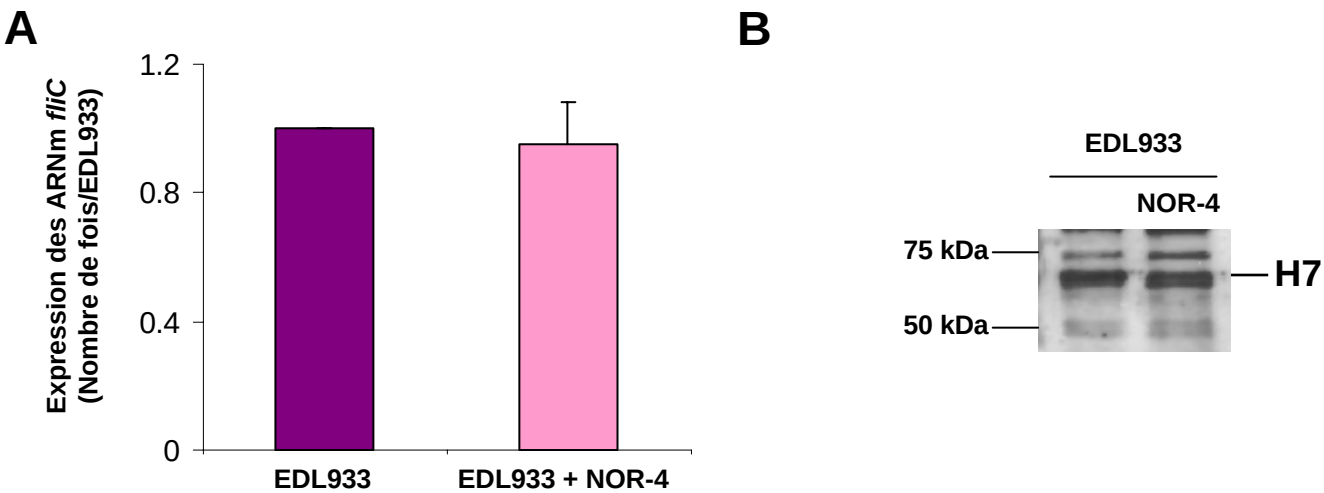
La souche EDL933 a été traitée ou non avec NOR-4 ou cPTIO; la MC a été ajoutée 6h après le début de la culture. Le niveau d'expression des ARNm *stx2* (A) et la concentration en Stx2 (B) ont été respectivement analysés 2 h et 12 h après le traitement par la MC. *, $P<0,05$; **, $P<0,01$ en comparaison des bactéries non traitées ou traitées avec MC + NOR-4; n = 5.

Figure 5: Rôle des différents donneurs de NO sur la production de Stx2



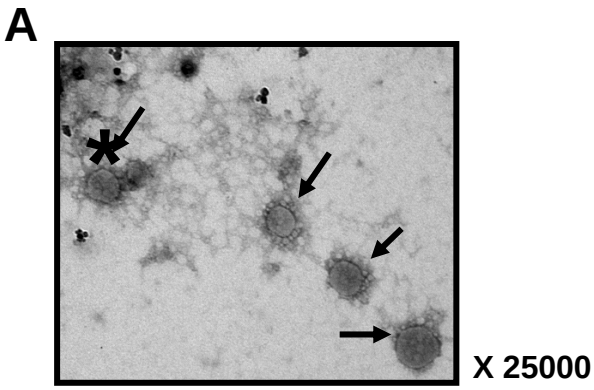
La souche EDL933 a été traitée ou non pendant 6 h par 200 μM de NOR-3, NOR-4 ou DEA-NONOate (DEA). La MC a été ajoutée et la concentration en Stx2 a été déterminée par ELISA 12 h après. *, *P*<0,05 en comparaison des autres conditions; n = 3.

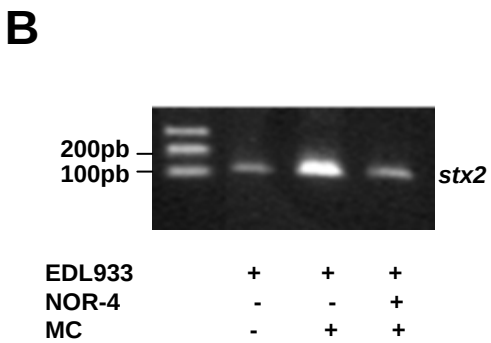
Figure 6: Effet du NO sur l'expression du gène *fliC* et sur la synthèse de flagelline

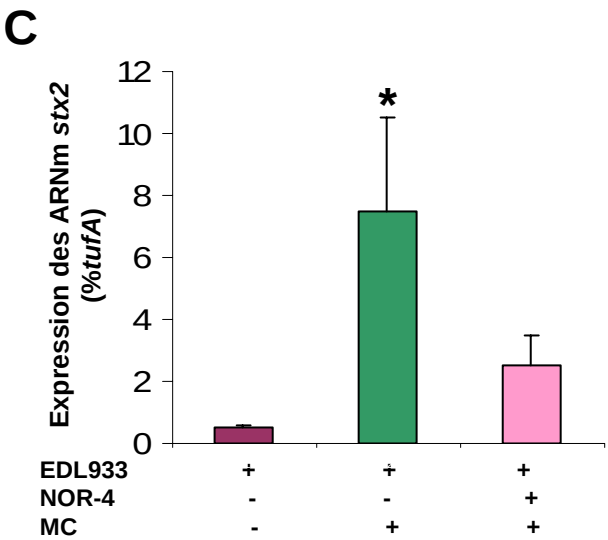


La souche EDL933 a été traitée ou non par NOR-4. L'expression relative du gène *fliC* a été analysée par PCR semi-quantitative (A; n = 3) et la présence de flagelline H7 a été déterminée par Western-blot (B).

Figure 7: NOR-4 diminue la synthèse de phages BP-933W







Les phages ont été concentrés à partir de surnageants bactériens et visualisés par microscopie électronique (A). La présence du gène *stx2* dans les suspensions phagiques a été analysée par PCR (B) et PCR en temps réel (C). *, $P<0,05$ en comparaison des bactéries non traitées ou traitées avec MC + NOR-4; n = 3.

Enfin, l'effet inhibiteur a été observé avec NOR-3 mais pas avec le DEA-NONOate (Fig. 5), suggérant qu'une exposition prolongée au NO plutôt qu'un stress nitrosant est responsable de l'inhibition de l'expression du gène *stx2*.

II-3. Effet du NO sur l'expression du gène *fliC*

Afin de savoir si NO agit spécifiquement sur l'expression de *stx2* ou possède un effet plus général sur la transcription des gènes, nous nous sommes intéressés à l'expression du gène *fliC*, reconnu pour être exprimé en phase stationnaire. Par PCR semi-quantitative, nous avons démontré que l'expression du gène *fliC* n'a pas été altérée par 200 µM de NOR-4 (Fig. 6A). De même, la production de flagelline, analysée par Western-blot, n'a pas été modifiée lors du traitement des bactéries par NO (Fig. 6B).

III. NO DIMINUE LA SYNTHÈSE DE PHAGES BP-933W

Le gène *stx2* de la souche EDL933 est porté par le phage BP-933W intégré dans le génome bactérien. Puisque NOR-4 inhibe l'expression des ARNm *stx2*, nous avons supposé que NOR-4 pourrait supprimer la production et la libération de phages portant *stx2*.

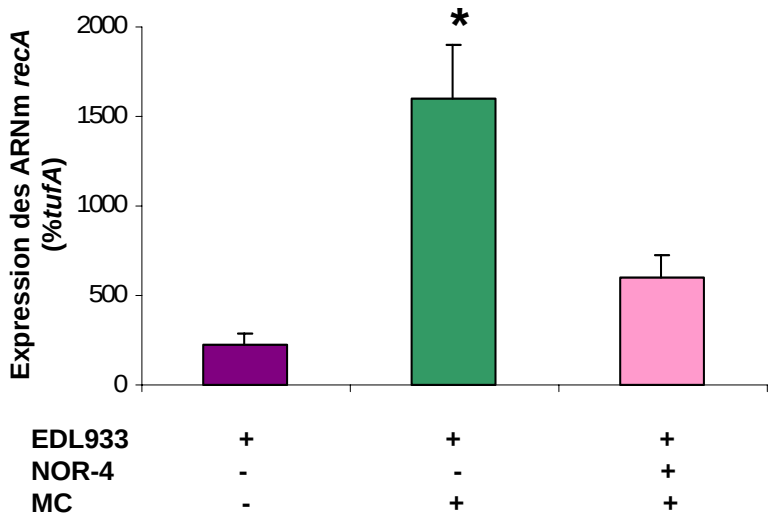
Les particules phagiques ont été concentrées à partir des surnageants de culture d'EDL933 exposés ou non à la MC et/ou à NOR-4. Après concentration, la présence de phages a été visualisée par microscopie électronique pour chaque échantillon (Fig. 7A). Nous avons ensuite analysé par PCR et PCR en temps réel la présence du gène *stx2* dans le génome viral de chaque échantillon. Le nombre de phages BP-933W est plus important dans le surnageant de bactéries traitées à la MC que dans les surnageants de bactéries non traitées (Fig. 7B). En présence de NOR-4, cette augmentation a été inhibée significativement de 79,2 ± 5,2% (Fig. 7C).

IV. NO EST UN INHIBITEUR DE LA RÉPONSE SOS DES EHEC

RecA est la protéine majeure impliquée dans la réponse SOS chez les EHEC. Son activation induit l'auto-clivage de cI, le répresseur du phage *stx*, et de LexA, le répresseur du gène *recA*. Ainsi, lorsque la protéine RecA est activée, elle permet l'expression de son propre gène.

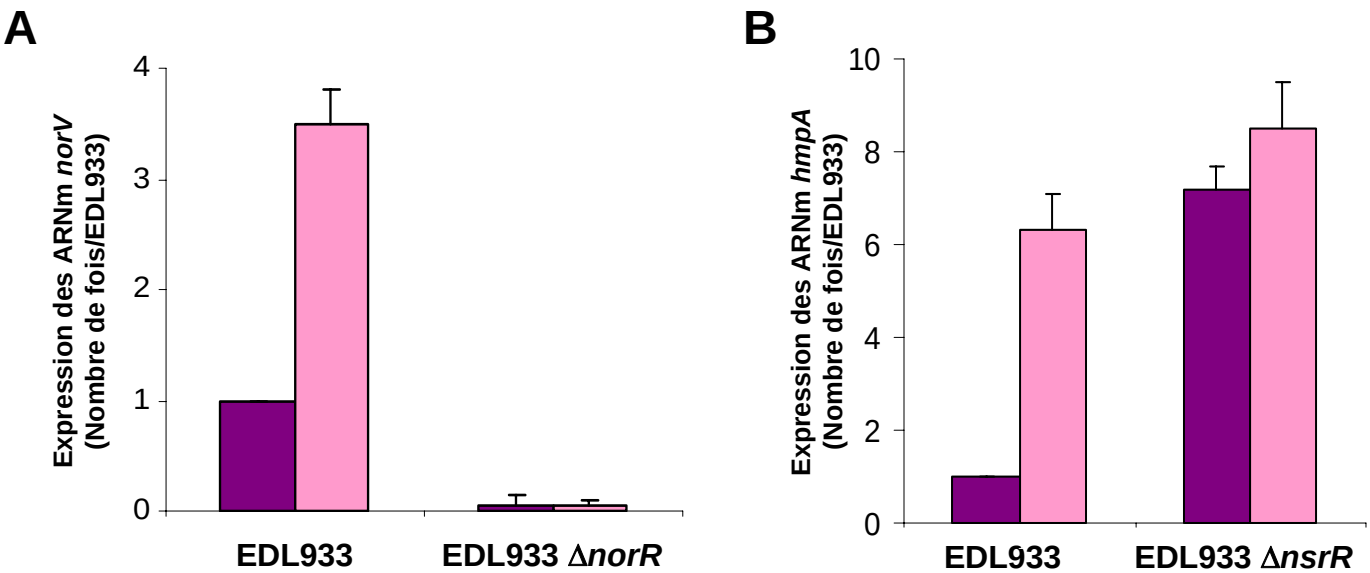
Pour comprendre plus en détail le mécanisme par lequel NO inhibe l'expression du gène *stx2,* nous avons analysé l'effet de NOR-4 sur l'expression du gène *recA*. Pour cela, les bactéries ont été traitées par la MC afin d'induire la réponse SOS en présence ou absence de

Figure 8: NO inhibe l'expression du gène *recA*



EDL933 a été cultivée en présence ou absence de NOR-4. La MC a été ajoutée 6h après le début du traitement. L'expression des ARNm de *recA* a été analysée par PCR en temps réel 2 h après l'ajout de MC. *, $P<0,05$ *vs*. les autres conditions; n = 3.

Figure 9: Vérification phénotypique des mutants EDL933 Δ*norR* et EDL933 Δ*nsrR*



Les souches EDL933, EDL933 Δ*norR* ou EDL933 Δ*nsrR* ont été cultivées en présence (barres roses) ou absence (barres violettes) de 200 μM de NOR-4. L'expression du gène *norV* (A) et l'expression du gène *hmpA* (B) ont été analysées par PCR semi-quantitative; n = 3.

NOR-4. L'expression des ARNm de *recA* a été induite d'environ 9 fois par la MC par rapport aux bactéries non traitées. Cette augmentation a été significativement inhibée d'environ 60% en présence de NOR-4 (Fig. 8).

De façon spontanée (non induite par MC), l'expression du gène *recA* a été également diminuée de 60,8 ± 1,8% quand la souche EDL933 a été traitée pendant 18 h avec NOR-4 (Fig. 8).

V. IMPLICATION DES SENSEURS NorR ET NsrR

V-1. Caractérisation phénotypique des mutants

NorR et NsrR sont les deux senseurs principaux de NO chez *E. coli*. Nous avons construit les mutants isogéniques pour les gènes *norR* et *nsrR* dans la souche EDL933. Par PCR et séquençage nous avons confirmé nos mutations. Néanmoins, nous avons effectué une caractérisation phénotypique de ces mutants.

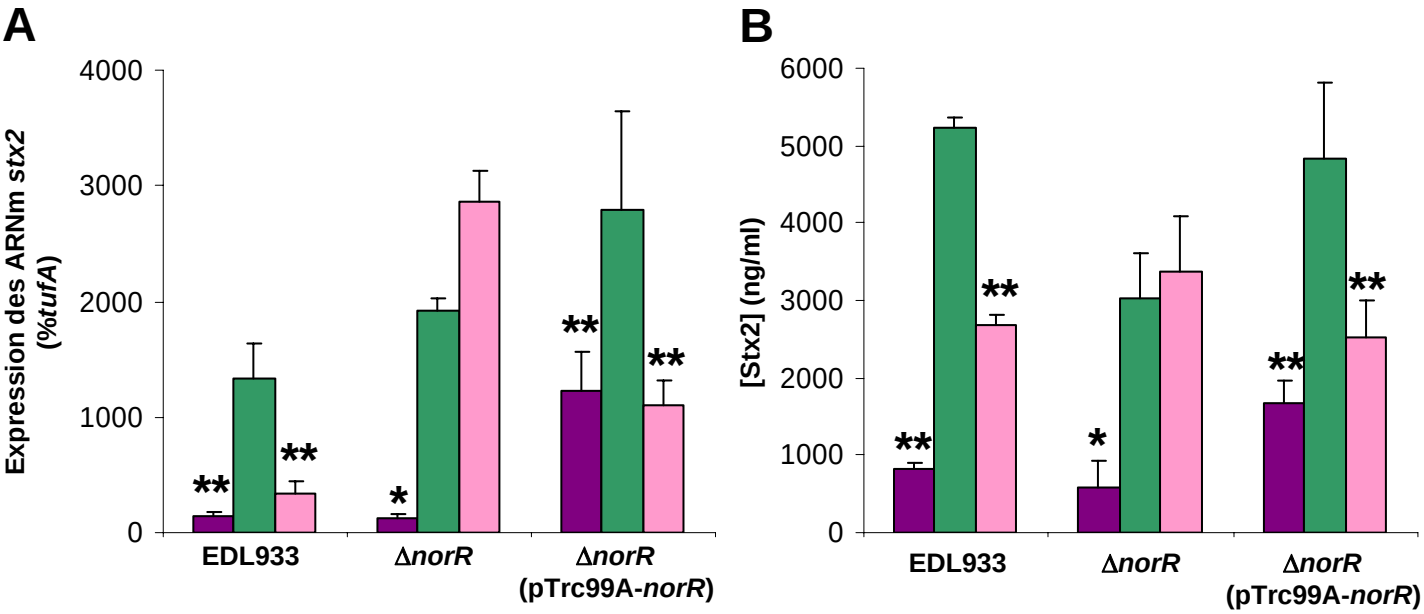
Les mutants Δ*norR* et Δ*nsrR* ont une courbe de croissance identique à la souche sauvage. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de différence de susceptibilité au NO entre les mutants et EDL933 (résultats non montrés).

Nous avons également analysé l'expression de gènes cibles de NorR et NsrR. NorR est reconnu pour être un activateur transcriptionnel de gènes incluant l'opéron *norVW*. Afin de vérifier le mutant Δ*norR*, nous avons analysé l'expression du gène *norV* par PCR en temps réel en présence ou absence de 200 µM NOR-4. Les résultats ont montré que l'ajout de NO entraine une augmentation de l'expression des ARNm de *norV* dans la souche EDL933. En revanche, aucune expression du gène *norV* n'a été observée dans le mutant Δ*norR* traité ou non par NOR-4 (Fig. 9A).

NsrR est un répresseur transcriptionnel et sa fixation à l'ADN est inhibée par NO. Un des gènes cibles réprimé par NsrR est *hmpA* (Filenko N et coll., 2007), dont l'expression est induite en présence de NO. Ainsi, lorsque la souche EDL933 a été traitée par NO, l'expression de *hmpA* a été augmentée de ~ 6 fois (Fig. 9B); de même, dans le mutant Δ*nsrR*, nous avons observé une augmentation spontanée du niveau d'expression de ce gène qui n'a pas été modulée significativement par NO (Fig. 9B).

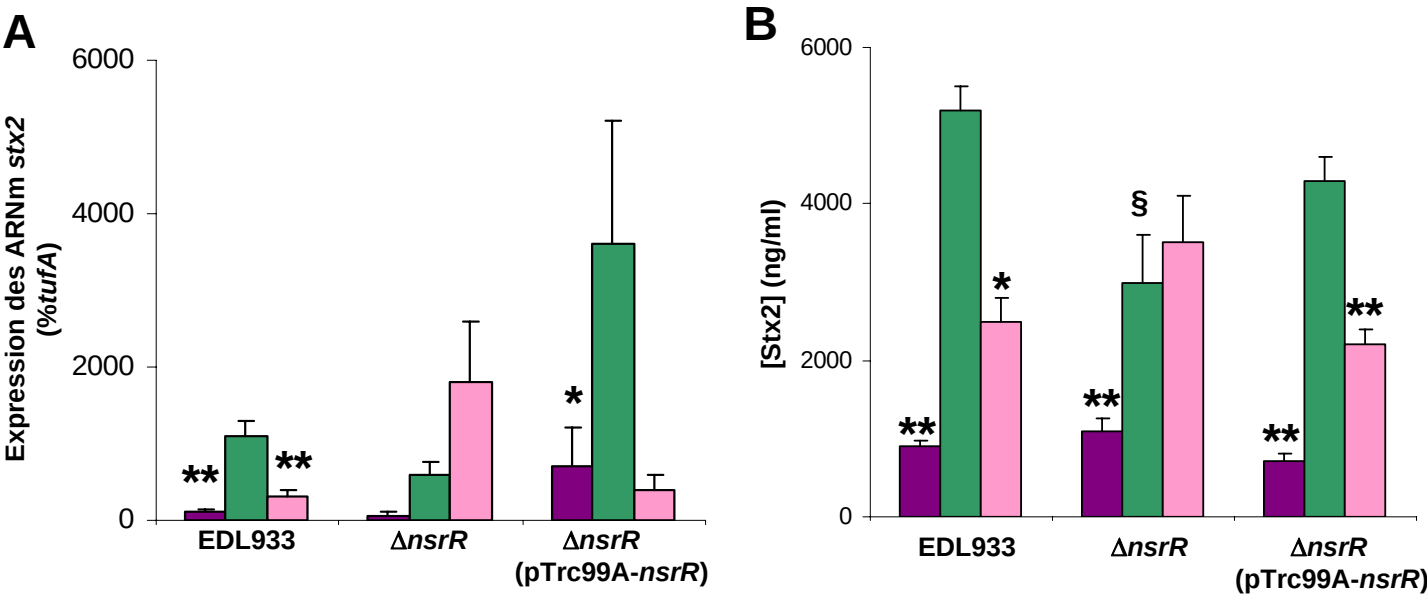
Enfin, les gènes *nsrR* et *vacB* constituent un opéron. Le gène *vacB* code pour une RNase R. Nous avons donc analysé la polarité de la mutation *nsrR* sur l'expression de *vacB*. L'expression relative des ARNm *vacB* dans la souche EDL933 Δ*nsrR* a été de 0,9 ± 0,08 par

Figure 10: Modulation de l'expression du gène *stx2* dans le mutant EDL933 Δ*norR*



Les souches EDL933, Δ*norR* et Δ*norR(pTrc99A-norR)* ont été cultivées seules (barres violettes), traitées avec la MC (barres vertes) ou avec NOR-4 + MC (barres roses). L'expression du gène *stx2* (A) et la [Stx2] (B) ont été analysées 2 et 12 h après l'ajout de MC. *, *P*<0,05; **, *P*<0,01 *vs*. les bactéries traitées avec la MC; n = 3-5.

Figure 11: Modulation de l'expression du gène *stx2* dans le mutant EDL933 Δ*nsrR*



Les souches EDL933, Δ*nsrR* et Δ*nsrR*(pTrc99A-*nsrR*) ont été cultivées seules (barres violettes), traitées avec la MC (barres vertes) ou NOR-4 + MC (barres roses). L'expression du gène *stx2* (A) et la [Stx2] (B) ont été analysées 2 et 12 h après l'ajout de MC. *, *P*<0,05; **, *P*<0,01 vs. les bactéries traitées avec la MC; §, *P*<0,05 *vs*. EDL933 et EDL933 Δ*nsrR*(pTrc99A-*nsrR*) en présence de MC; n = 3-5.

rapport à la souche sauvage. Les résultats montrent donc que l'expression du gène *vacB* n'est pas modifiée dans le mutant Δ*nsrR* par rapport à la souche sauvage, ce qui suggère qu'il n'y a pas de polarité de la mutation *nsrR* sur l'expression du gène *vacB*.

V-2. Effet des mutations sur l'expression de *stx2*

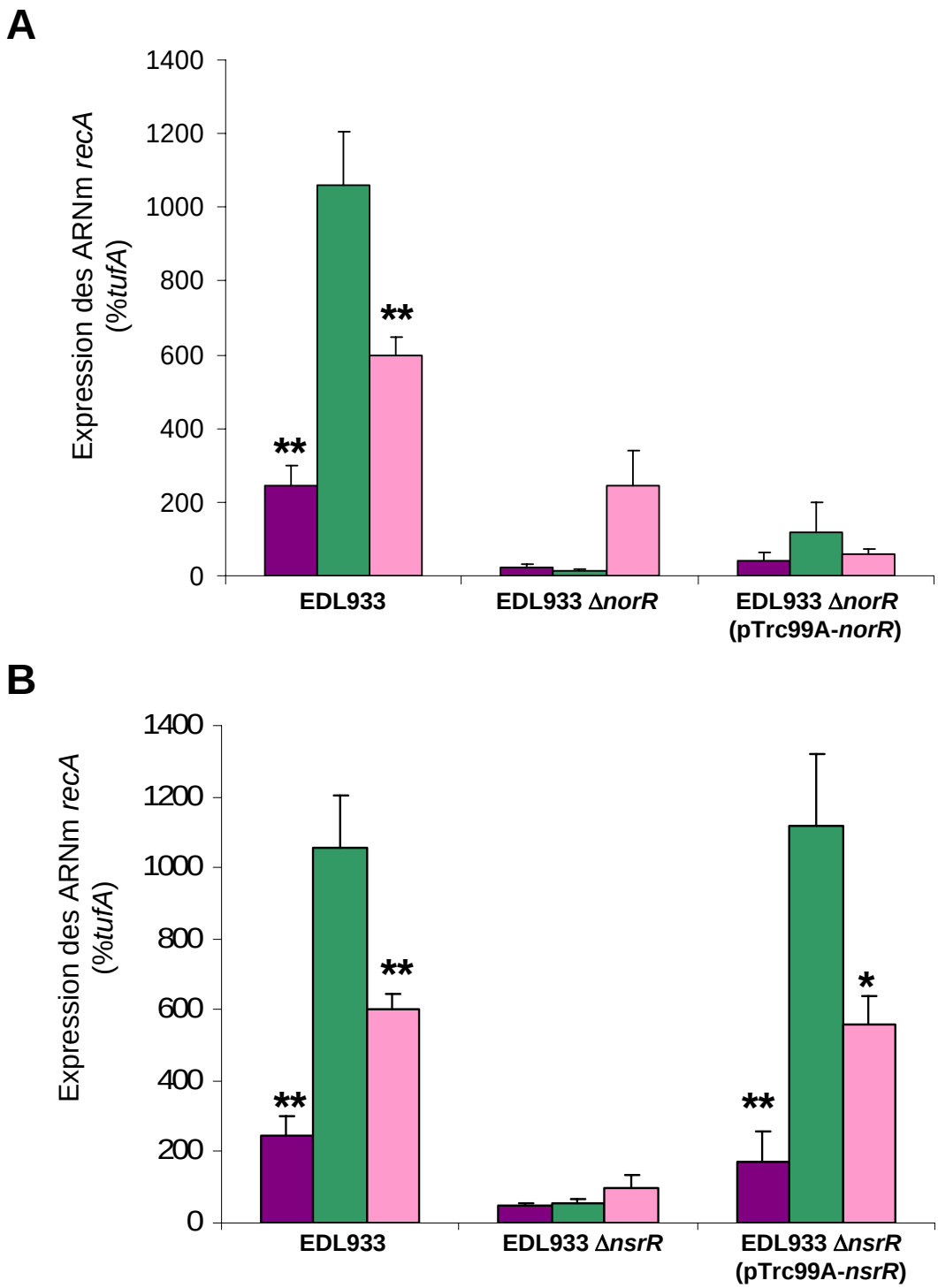
L'expression du gène *stx2* et la production de Stx2 n'ont pas été modulées de façon significative dans un mutant Δ*norR* par rapport à EDL933 en condition basale et/ou induite par la MC (Fig. 10A B). Néanmoins, l'activité inhibitrice de NO sur l'expression du gène *stx2* (Fig. 9A) et sur la production de Stx2 (Fig. 9B) sur la souche EDL933 traitée par la MC n'a pas été observée pour la souche EDL933 Δ*norR*. En revanche, la souche sauvage et le mutant complémenté Δ*norR* (pTrc99A-*norR*) ont montré des réponses similaires lors de la stimulation par la MC et/ou NOR-4 (Fig. 10A et B). Ces résultats suggèrent que NorR est impliqué dans le mécanisme d'inhibition de la production de Stx2 par NO.

L'expression du gène *stx2* et la production de Stx2 n'ont pas été modulées dans le mutant Δ*nsrR* ni dans la souche complémentée Δ*nsrR* (pTrc99A-nsrR) en comparaison à la souche sauvage en condition basale (Fig. 11A et B). Cependant, la production de Stx2 dans la souche Δ*nsrR* traitée par la MC a été diminuée de façon significative en comparaison de la souche sauvage et de la souche complémentée en condition induite (Fig. 11B) ; des résultats identiques mais non significatifs ont été observés au niveau transcriptionnel (Fig. 11A). De façon intéressante, l'effet inhibiteur du NO sur l'expression des ARNm *stx2* et la production de Stx2 dans la souche EDL933 n'a pas été retrouvé dans le mutant Δ*nsrR* (Fig. 11A et B). En revanche, des réponses similaires à la MC et/ou au traitement par NO ont été observées pour la souche sauvage et le mutant complémenté Δ*nsrR* (pTrc99A-*nsrR*) (Fig. 11A et B). Ces données indiquent donc que NsrR est également impliqué dans l'inhibition de l'expression de *stx2* par NO.

V-3. Effet des mutations sur l'expression de *recA*

De façon attendue, l'expression du gène *recA* a été augmentée dans la souche EDL933 traitée avec la MC ; cette augmentation a été inhibée en présence de NOR-4 (Fig. 12A et B). Dans le mutant Δ*norR* et dans la souche mutée complémentée, nous avons observé une diminution significative de l'expression de *recA* en condition basale, en présence de MC ou de MC et de NOR-4, en comparaison de la souche sauvage (Fig. 12A).

Figure 12: Modulation de l'expression du gène *recA* dans le mutants Δ*norR et* Δ*nsrR*



Les souches EDL933, Δ*norR*, Δ*norR*(pTrc99A-*norR*), Δ*nsrR* et Δ*nsrR*(pTrc99A-*nsrR*) ont été cultivées seules (barres violettes) ou traitées avec MC (barres vertes) ou NOR-4 + MC (barres roses). L'expression des ARNm *recA* a été analysée par PCR quantitative. *, $P<0,05$; **, $P<0,01$ *vs*. EDL933 + MC; n = 3.

Une diminution significative de l'expression du gène *recA* été observée dans le mutant Δ*nsrR* en comparaison de la souche sauvage pour chaque condition de culture. Un profil d'expression de *recA* identique a été observé pour la souche EDL933 et la souche EDL933 Δ*nsrR* (pTrc99A-*nsrR*) (Fig. 12B).

VI. EFFET DU NO PRODUIT PAR DES CELLULES ACTIVÉES

VI-1. Expression de *stx2* dans les co-cultures EHEC/cellules Hct-8

Après avoir étudié l'effet du NO produit par une source chimique, nous avons analysé l'effet du NO synthétisé par des cellules épithéliales du côlon humain. Ces cellules ont été activées pendant 24 h par des cytokines reconnues pour induire l'expression de la iNOS et la production de NO. Puis les bactéries ont été mises en contact pendant 18 h avec les cellules pour étudier l'expression du gène *stx2*.

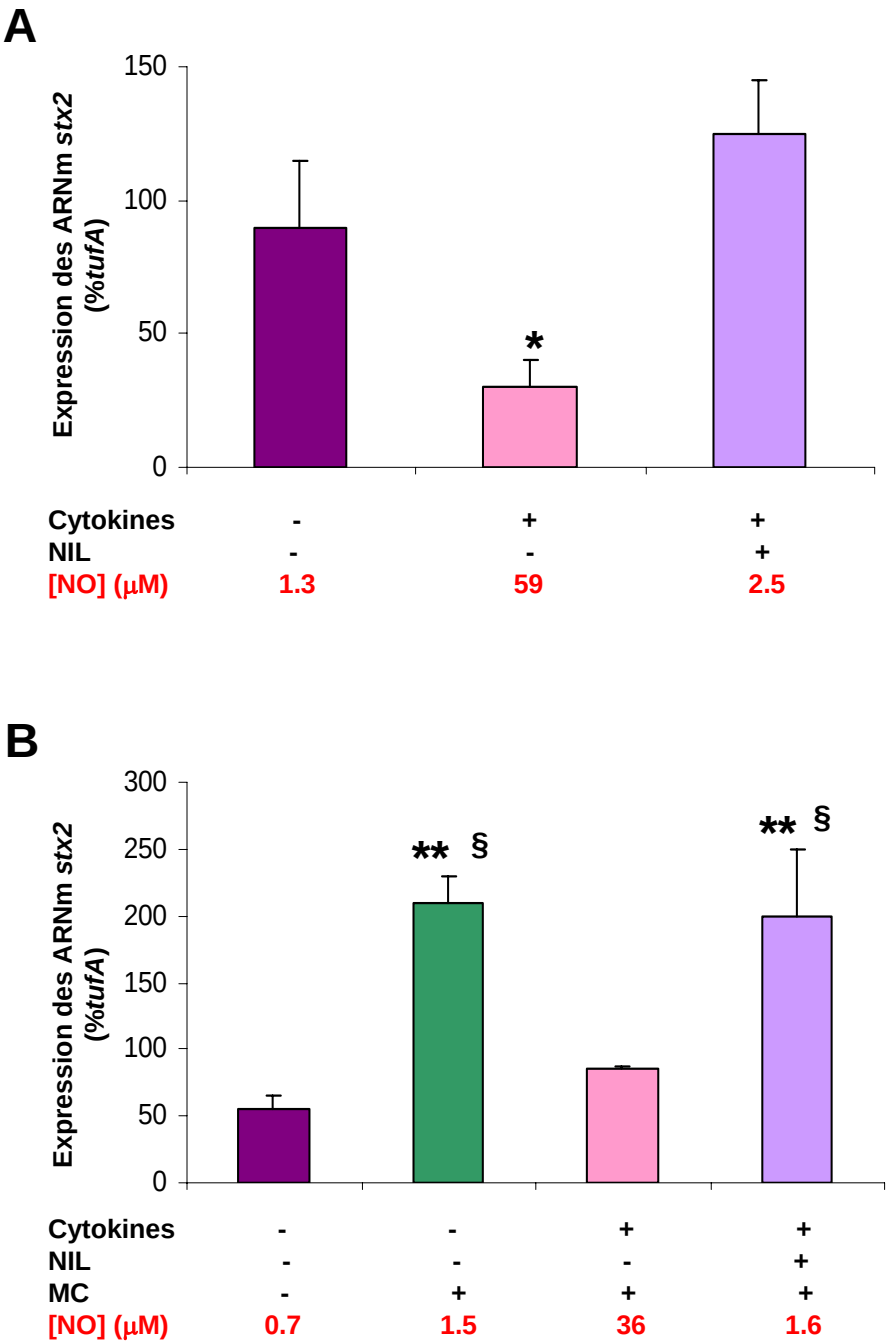
Comme indiqué sur la Fig. 13, les cellules Hct-8 activées par le cocktail de cytokines produisent NO pendant les 8 et 18 h de culture qui suivent le traitement par les cytokines ; cette synthèse est totalement inhibée par le L-NIL. Il est important de préciser que ces cellules ne produisent que NO_3^- et non pas NO_2^- ; par ailleurs, les dosages ont été effectués dans des puits sans bactérie car les EHEC possèdent des NO_3^- et NO_2^- réductases qui catabolisent ces espèces réactives nitrogénées dès leur production par les cellules.

Une inhibition de l'expression spontanée du gène *stx2* a été observée lorsque les EHEC ont été co-cultivées avec les cellules productrices de NO (cellules activées) en comparaison avec l'expression de *stx2* de bactéries co-cultivées avec des cellules non stimulées (Fig. 13A). L'ajout de L-NIL aux cellules activées a supprimé l'inhibition de l'expression du gène *stx2* observée dans les co-cultures EHEC/Hct-8 activées (Fig. 13A).

Pour analyser l'expression de *stx2* en condition induite, les bactéries ont été mises en contact des cellules pendant 6 h puis la MC a été ajoutée aux co-cultures et l'expression des ARNm a été analysée 2 h après (Fig. 13B).

L'expression du gène *stx2* a été significativement augmentée de 7 fois en présence de MC dans les co-cultures EHEC/Hct-8 non activées. Cette augmentation a été inhibée d'environ 55% quand les bactéries ont été mises au contact des cellules Hct-8 productrices de NO. Cette inhibition n'a pas été observée lorsque le L-NIL a été utilisé dans les cultures de cellules activées.

Figure 13: Le NO produit par les cellules épithéliales activées inhibe l'expression du gène *stx2*



Les cellules épithéliales intestinales humaines Hct-8 ont été activées ou non par des cytokines pendant 24 h. Le milieu a été changé et la souche EDL933 a été ajoutée aux cellules en présence ou absence de NIL. (A) Le niveau des ARNm *stx2* a été déterminé par PCR en temps réel après 18 h de co-culture. (B) La MC a été ajoutée 6 h après le début de la coculture. Le niveau des ARNm *stx2* a été analysé 2 h après le traitement à la MC. [NO] représente la moyenne de 4 mesures de concentration NO_3^-/NO_2^- réalisée sur des surnageants de cellules cultivées à 18 h (A) et 8 h (B) sans bactérie. *, $P<0,05$; **, $P<0,01$ *vs*. EDL933 co-cultivée avec des cellules non activées; §, $P<0,05$ *vs*. EDL933 co-cultivée avec des cellules activées en présence de MC; n = 3-4.

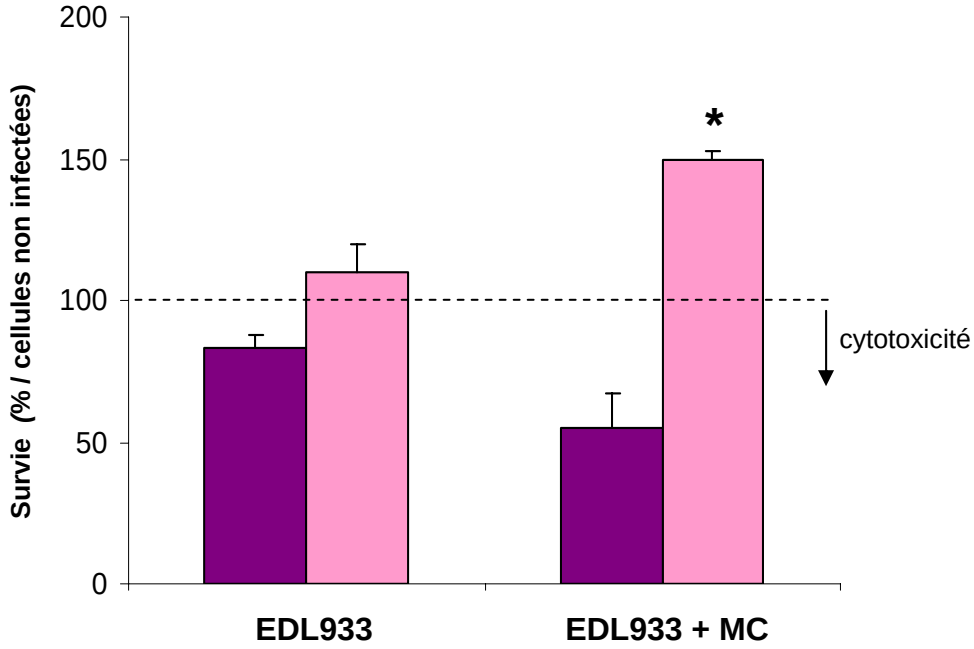
Nous avons par ailleurs dosé la concentration en Stx2 dans les surnageants de co-cultures. Stx2 n'a pas été détectée dans ces milieux. Nous suggérons que la toxine a été internalisée dans les cellules dès sa synthèse par les EHEC.

VI-2. Mesure de la cytotoxicité des EHEC

Nous avons confirmé nos résultats par la mesure de la cytotoxicité de la souche EDL933 dans nos différentes conditions. Sans MC, EDL933 induit la mortalité de 15% des cellules Hct-8 environ (Fig. 14). Cette cytotoxicité est complètement inhibée quand les cellules ont été traitées par des cytokines et donc produisent du NO. En présence de MC, la cytotoxicité d'EDL933 sur les cellules contrôles et activées a été respectivement de 39% et 0%. La survie n'a pas été modifiée quand les cellules ont été traitées avec des cytokines ou avec la MC sans bactérie.

Ainsi, EDL933 est moins cytotoxique sur les cellules activées, suggérant que la production de Stx par les bactéries est moins importante au contact de cellules produisant du NO.

Figure 14: Mesure de la cytotoxicité des EHEC sur les cellules Hct-8



Les cellules contrôles (violet) ou stimulées par des cytokines (rose) ont été co-cultivées avec la souche EDL933 en présence ou absence de MC. Après 6h, les cellules ont été lavées et la cytotoxicité a été mesurée par une coloration au cristal violet. *, *P*<0,05 *vs*. les cellules contrôles co-cultivées avec EDL933 + MC; n = 4.

DISCUSSION

Les symptômes hémorragiques les plus graves provoqués par les EHEC sont dus à la toxine Stx. Ainsi, de nombreuses études ont eu pour but de trouver des moyens pour neutraliser les Stx. À ce titre, des agents pharmacologiques (Nishikawa K et coll., 2006), des Ac spécifiques de Stx (Sheoran AS et coll., 2005; Wen SX et coll., 2006), ou des bactéries recombinantes exprimant Gb3 (Paton AW et coll., 2000) ont été développés. Nos résultats indiquent que le NO, un médiateur essentiel de la réponse immune innée mucosale, est un inhibiteur de la synthèse de Stx2 par les EHEC. Ainsi, augmenter la production de NO chez des patients infectés par des EHEC pourrait représenter une nouvelle stratégie thérapeutique pour limiter le développement des SHU/PTT. L'administration d'arginine, le substrat de la NOS, ou de donneurs de NO, pourrait être ainsi envisagée. Par ailleurs, cette stratégie thérapeutique présenterait l'originalité d'empêcher la production de Stx plutôt que de neutraliser les toxines après leur production.

Dans un premier temps nous avons établi que des concentrations de NO inférieures à 500 µM ne sont pas cytotoxiques pour les EHEC. D'autres travaux ont par ailleurs démontré que des concentrations similaires en NO ne modifient pas la croissance de *E. coli* ou de *C. rodentium* (Spek EJ et coll., 2001; Vallance BA et coll., 2002; Schapiro JM et coll., 2003). Puis, contrairement à notre hypothèse de départ dans laquelle nous suggérions que le NO serait un inducteur de la production de Stx, nous avons démontré, au contraire, que le NO libéré par NOR-4 est capable d'inhiber l'expression des ARNm *stx2* à 18 h et 24 h dans la souche EDL933 et par conséquent de diminuer la production de Stx2 de façon significative. De plus, l'utilisation d'un chélateur de NO, le cPTIO, permet de restaurer l'effet inhibiteur observé avec NOR-4, confirmant que l'inhibition de l'expression de *stx2* est due à NO. Nous avons par ailleurs démontré un effet inhibiteur du NO sur *i*) la lyse des EHEC induite par la MC *ii*) l'expression de *stx2* induite par la MC et *iii*) la synthèse de phages stx2. La production inductible de Stx2 étant associée à une lyse bactérienne due à la synthèse de phage BP-933W, ces trois résultats sont cohérents. De façon similaire, il a été montré que l'utilisation de glutathion-*S*-nitrosylé dans des cultures d'*E. coli* supprime l'effet bactéricide de H_2O_2 et de l'acide hypochloreux (Marcinkiewicz J et coll., 1997). En parallèle, nous avons montré que le NO et ses dérivés produits par des cellules épithéliales intestinales humaines activées par un

cocktail de cytokines inhibent l'expression du gène *stx2* et la libération de Stx2 ; ce dernier point a été validé indirectement à travers la cytotoxicité des EHEC sur les cellules Hct-8.

Concernant Stx1, son expression et sa synthèse n'ont pas été observées dans nos conditions expérimentales et n'ont pas été modulées par NOR-4. Cet effet est probablement du à la présence de fer, un régulateur négatif de la transcription de *stx1* (O'Brien AD et coll., 1982), dans les milieux de culture.

Par la suite, nous avons montré que NO inhibe l'expression du gène *stx2* via une inhibition de l'activation spontanée et induite de RecA, protéine majeure de la réponse SOS. Des études ont montré que RecA contribue à l'induction spontanée de la libération de phage et la production de Stx chez la souche EDL933 et 86-24 (Fuchs S et coll., 1999). Ainsi, nous proposons que NO inhibe l'expression des ARNm *stx2* en condition spontanée et induite par le même mécanisme, à savoir l'inhibition de l'activation de RecA. De nombreuses études ont démontré l'implication des espèces nitrogénées dans la formation de dommages à l'ADN ; ainsi, nos travaux démontrant que NO est associé à la diminution de la réponse SOS et à l'inhibition de l'expression du gène *stx2* peuvent paraître surprenants. Cependant, la quantité et la durée d'exposition des bactéries au NO semblent être essentielles dans l'effet du NO et peuvent expliquer nos résultats. En effet, NO libéré rapidement et en grande quantité (35 nmol/ml/min contre 0.5 nmol/ml/min dans nos expériences) pourrait agir comme un inducteur de la réponse SOS chez *E. coli* ; dans ces conditions, la délétion de *recA* conduit à une augmentation de la sensibilité au NO (Spek EJ et coll., 2001), démontrant que la réponse SOS est induite et essentielle pour combattre l'effet toxique du NO. Par contre, des quantités 'physiologiques' de NO n'induisent aucun effet sur la réponse SOS chez *S. enterica* (Schapiro JM et coll., 2003). De plus, des analyses transcriptomiques chez *E. coli* établissent que l'expression des gènes de la réponse SOS n'est pas augmentée en présence de NO (Mukhopadhyay P et coll., 2004; Flatley J et coll., 2005; Justino MC et coll., 2005). Nous avons par ailleurs observé que l'expression des ARNm de *stx2* n'est pas modulée quand les bactéries sont traitées en même temps avec MC et NOR-4. Bien que ces résultats puissent s'expliquer par le délai de plusieurs heures nécessaire pour générer des quantités significatives de NO, nous suggérons que l'inhibition de la réponse SOS et de l'expression du gène *stx2* sont liées à une longue exposition des EHEC au NO. Pour renforcer cette hypothèse, nous avons montré que *i*) l'effet inhibiteur du NO n'est observé qu'après une longue exposition au NO (> 6 h) en condition basale, et *ii*) la réponse SOS et la production de Stx2 chez EDL933 ont été inhibées quand les EHEC ont été traitées avec des donneurs de NO

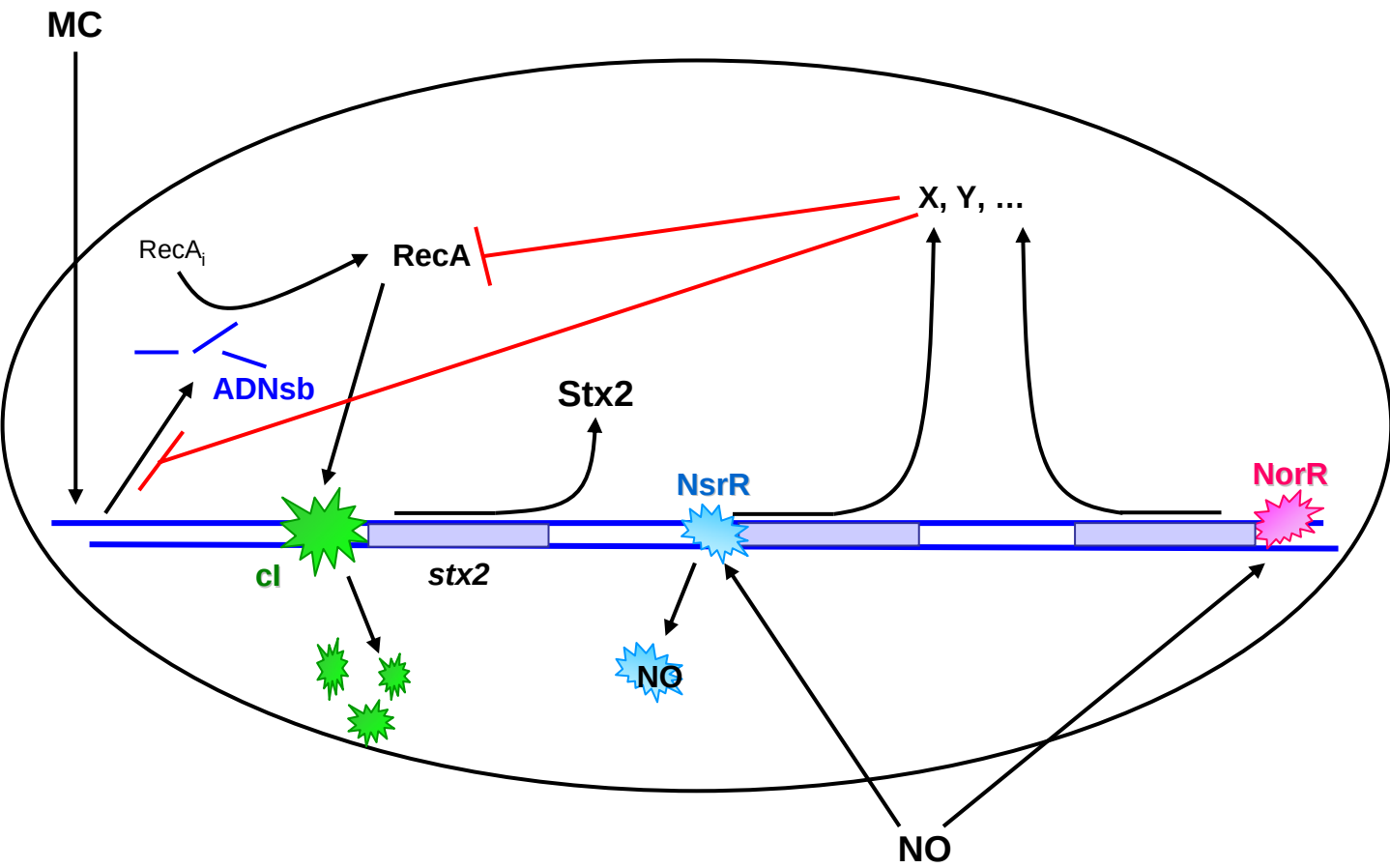
ayant une demi-vie élevée (NOR-3 et NOR-4), tandis que le DEA-NONOate qui libère du NO en quelques minutes n'a pas modifié l'expression des ARNm *stx2*.

Nous avons également recherché l'effet des deux principaux senseurs de NO chez *E. coli*, NorR et NsrR, dans l'inhibition de l'expression de *stx2* par NO. Nos résultats ont montré que ces deux senseurs sont impliqués dans l'effet inhibiteur du NO. En effet, la mutation du gène *norR* supprime l'inhibition de l'expression de *stx2* dépendante de NO, et le phénotype de la souche sauvage a été restauré dans la souche mutée complémentée. De plus, nous avons observé que la mutation *nsrR* provoque une diminution de l'expression du gène *stx2* lors de l'induction par la MC. Cette donnée nous conduit à proposer que la suppression de l'association de NsrR à l'ADN, soit par l'effet du NO, soit par la délétion du gène, conduit à la diminution de l'expression de *stx2*. Ces données suggèrent que NorR et NsrR modulent l'expression d'un/de gène(s) impliqué(s) dans la régulation négative du phage BP-933W.

En ce qui concerne l'expression du gène *recA*, nous avons montré que son expression a été diminuée dans la souche EDL933 Δ*nsrR* en comparaison de la souche sauvage, quelle que soit la condition testée (avec ou sans MC ou NOR-4), la souche complémentée ayant montré un profil identique à celui d'EDL933 ; ces données suggèrent donc que NsrR régule négativement l'expression de gène(s) impliqué(s) dans l'inhibition de la réponse SOS des EHEC. En revanche, il nous a paru surprenant d'observer une diminution de l'expression de *recA* dans la souche EDL933 Δ*norR* et dans la souche EDL933 Δ*norR* (pTrc99A-*norR*) par rapport à la souche sauvage. Nous pouvons supposer que la délétion du gène *norR* a permis l'expression spontanée de gène(s) impliqué(s) dans l'inhibition de la réponse SOS des EHEC, comme pour la délétion de *nsrR*. Néanmoins, cet effet de la mutation aurait du être également observé sur l'expression de *stx2* ; or nous n'avons pas observé de diminution spontanée de l'expression de ce gène dans le mutant Δ*norR*. De plus, la complémentation en trans du gène codant pour NorR n'a pas permis de restaurer le phénotype sauvage. Néanmoins, nos résultats suggèrent que l'expression du gène *recA* induite par la MC est également régulée par NorR et NsrR, suggérant qu'en présence de NO ces senseurs inhibent la synthèse de Stx2 via une inhibition de la réponse SOS.

Ainsi, puisque les deux senseurs de NO sont impliqués dans la régulation de l'expression du gène *stx2*, l'hypothèse qu'un régulateur unique de la réponse SOS induit par NO soit responsable de cette inhibition est peu probable. Au contraire, nous proposons qu'un mécanisme général bactérien soit responsable de l'effet inhibiteur : Les EHEC traités par NO

Figure 15: Modèle d'inhibition de la production de Stx2 par NO



La MC induit l'activation de la protéine RecA qui permet le clivage du répresseur cI, conduisant à l'expression du gène *stx2*. NO via NorR et NsrR induit l'expression de facteurs X, Y, …. Ces derniers inhiberaient l'activation de RecA ou diminueraient les dommages à l'ADN dépendant de la MC, limitant ainsi la production de Stx2.

de façon progressive exprimeraient des facteurs généraux de résistance au stress et/ou de réparation de l'ADN. Ces derniers permettraient aux bactéries de résister à l'effet de la MC en limitant la mise en place du système SOS et donc l'expression des gènes *stx2*. Ce modèle est présenté sur la Fig. 15.

Nous avons par ailleurs démontré que l'inhibition de la production de Stx2 n'est pas obtenue uniquement avec du NO provenant de donneurs chimiques de NO mais également à partir de NO produit par des cellules épithéliales intestinales humaines activées. Il est donc possible qu'un tel mécanisme puisse avoir lieu *in vivo* chez des patients infectés. Compte-tenu de ce résultat, nous avons émis l'hypothèse que les bactéries au contact des cellules produisant du NO seraient moins cytotoxiques car elles produiraient moins de Stx2. En effet, nos données expérimentales ont démontré qu'en présence MC la souche EDL933 est moins cytotoxique pour les cellules épithéliales Hct-8 activées que pour les cellules contrôles. Il est important de noter que les cellules Hct-8 expriment le récepteur Gb-3 (Smith WE et coll., 2003), ce qui les rend susceptibles à Stx2.

Par ailleurs, il a été décrit que les gènes *stx* peuvent être transférés à des *E. coli* commensaux par transduction (Gamage SD et coll., 2006). Par conséquent, le microbiote intestinal peut produire Stx et participer au développement des syndromes hémorragiques. Ainsi, en inhibant la synthèse et la dissémination de particules phagiques, NO pourrait exercer un effet protecteur collatéral en réduisant l'infection du microbiote intestinal par les phages BP-933W. De plus, il a été décrit que Stx2 joue un rôle important dans la colonisation des EHEC en favorisant l'adhérence aux entérocytes (Robinson CM et coll., 2006); nous proposons donc que l'inhibition de la synthèse de Stx2 par NO pourrait diminuer la colonisation de l'épithélium intestinal par les EHEC.

En conclusion, nos résultats démontrent pour la première fois que NO peut moduler la production d'une toxine par des bactéries pathogènes sans altérer leur viabilité. Nos résultats présentent également NO comme un inhibiteur potentiel de la réponse SOS chez *E. coli*. L'augmentation de la production de NO chez des patients infectés pourrait permettre de lutter contre la production de Stx et donc contre le développement des SHU.

PERSPECTIVES

L'inhibition de la production de Stx2 via une inhibition de la réponse SOS des EHEC dépendante de la voie de signalisation NO/NsrR a été établie.

En revanche, si NorR semble impliqué dans la modulation de l'expression du gène *stx2* par NO, l'effet de ce senseur de NO sur l'expression de *recA* reste à confirmer. Il est étonnant d'avoir observé une diminution spontanée de l'expression de *recA* dans la souche EDL933 Δ*norR* puisque NorR doit être présent sur l'ADN et activé par NO pour induire la transcription. De plus, l'expression de *recA* observée dans la souche sauvage n'a pas été retrouvée dans la souche mutante complémentée. Nous devrons donc vérifier le phénotype d'EDL933 Δ*norR* (pTrc99A-*norR*) en réponse au NO et confirmer nos résultats par des expériences supplémentaires.

Par ailleurs, nous devrons déterminer le 'chainon manquant' entre 'NsrR/NorR' et l'inhibition de l'expression de *recA*. Quels sont les gènes régulés par ces deux senseurs et impliqués dans la régulation de l'expression *recA* ? Pour répondre à cette question, nous pourrions envisager une étude transcriptomique de la souche sauvage et des deux mutants en présence de MC.

Enfin, il serait pertinent de vérifier nos résultats *in vivo*. Des souris sauvages et déficientes pour la iNOS seront traitées par la streptomycine et infectées par des EHEC résistant à cet antibiotique (Funatogawa K et coll., 2002) ; l'expression de *stx2* et la production de Stx2 seront respectivement analysées à partir des bactéries adhérentes du côlon et présentes dans les fèces. Ces expériences ne seront réalisées qu'après mise en évidence de la production de NO par les souris infectées par les EHEC.

PUBLICATION n°1 :

NITRIC OXIDE INHIBITS SHIGA-TOXIN SYNTHESIS BY ENTEROHEMORRHAGIC *Escherichia coli*

PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 2007, 104 (24): 10199-10204.

Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*

Marjolaine Vareille, Thibaut de Sablet, Thomas Hindré, Christine Martin, and Alain P. Gobert*

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UR454 Unité de Microbiologie, Centre de Recherches de Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

Edited by Roy Curtiss, Arizona State University, Tempe, AZ, and approved May 3, 2007 (received for review March 20, 2007)

Shiga-toxin (Stx) is the cardinal virulence factor of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). The genes encoding Stx are carried by a lambdoid phage integrated in the bacterial genome and are fully expressed after a bacterial SOS response induced by DNA-damaging agents. Because nitric oxide (NO) is an essential mediator of the innate immune response of infected colonic mucosa, we aimed to determine its role in Stx production by EHEC. Here we demonstrate that chemical or cellular sources of NO inhibit spontaneous and mitomycin C-induced *stx* mRNA expression and Stx synthesis, without altering EHEC viability. The synthesis of *stx* phage is also reduced by NO. This inhibitory effect apparently occurs through the NO-mediated sensitization of EHEC because mutation of the NO sensor nitrite-sensitive repressor results in loss of NO inhibiting activity on *stx* expression. Thus our findings identify NO as an inhibitor of *stx* expressing-phage propagation and Stx release and thus as a potential protective factor limiting the development of hemolytic syndromes.

bacterial infection | mucosal immunology

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are pathogens carried by healthy rearing animals. After infection through the ingestion of contaminated food, EHEC colonize the large intestine and cause gastrointestinal diseases ranging from uncomplicated diarrhea to hemorrhagic colitis. Life-threatening complications, such as hemolytic–uremic syndrome (HUS), develop in ≈5–10% of EHEC-infected patients. HUS is defined by a triad of microangiopathic hemolytic anemia, thrombocytopenia, and acute renal failure, which can yield to a chronic renal failure and even death (1–3). O157:H7 is the main EHEC serotype implicated in HUS in Europe and North America (3). The few recent large outbreaks (4, 5) underline that prevention of primary infection in human remains an elusive goal. Therefore, understanding host–EHEC interactions remains a critical issue in fighting bacterial infection and HUS development.

The main EHEC virulence factor associated with severe human diseases is the Shiga toxin (Stx). Both Stx1 and Stx2 are heteropolymers constituted by a catalytic A subunit and five B subunits implicated in the binding to the receptor glycolipid globotriaosylceramide-3 of endothelial cells. Internalized Stx alters ribosomal function and induces the death of vascular cells (1, 3). Stx1 and Stx2 are encoded by two type λ lysogenic phages integrated in the bacterial genome (6). In a lysogen, the expression of the phage operons is controlled by the protein CI. As a result of EHEC exposure to DNA-damaging agents such as mitomycin C (7) or H_2O_2 (8), RecA, which is part of the so-called SOS response, is activated by single-strand DNA and promotes the autocleavage of CI (9). Then, a regulatory cascade yields to the respective expression of the genes encoding the antiterminators N and Q, Stx, and proteins of phage morphogenesis and lysis (9–13). Bacteria are lysed and release Stx and free phage particles in the medium.

An important hallmark of EHEC pathogenesis is the intestinal colonization resulting in attaching and effacing lesions and in induction of a strong mucosal innate immune response. Clinical studies have thus highlighted the strong levels of circulating chemokines and type 1 cytokines in HUS patients (14, 15). Other effectors of the nonspecific defense program can be produced by the inflamed mucosa, including nitric oxide (NO), a free radical that possesses numerous physiological properties notably in the immune system. Cellular production of NO requires the enzyme NO synthase that oxidizes L–arginine as a substrate; the calcium-independent inducible NO synthase (iNOS) isoform is expressed in numerous cells, e.g., enterocytes, in response to type 1 cytokines (16). High output of iNOS-derived NO is cytotoxic for pathogenic bacteria (17) or may induce transcriptomic changes (18–21) by interacting with different NO sensors such as the nitrite-sensitive repressor (NsrR), a key regulator of the nitrosative stress in enterobacteria (22, 23). NsrR DNA-binding activity is suppressed by NO, yielding to the expression of various genes involved in NO detoxification.

We now show that NO donors-derived NO signals in EHEC through NsrR to inhibit *stx2* mRNA expression, Stx2 synthesis, and *stx2*-phage release. Moreover, in the presence of NO, the expression of *recA* is down-regulated in mitomycin C-treated EHEC, providing a first line of evidence that NO suppresses the bacterial SOS response induced by DNA-damaging agents. In addition, we demonstrate that NO-producing cells inhibit *stx2* gene expression in EHEC/activated human epithelial cells cocultures. Switching the concept that NO is an inducer of the bacterial SOS response, we suggest that NO sensitizes and protects EHEC from DNA damages, thus inhibiting Stx synthesis.

Results

Effect of NO on EHEC Growth and Survival. To establish whether NO affects the growth of the strain EDL933, we treated bacterial suspensions with the NO donor NOR-4 (200 μM), in the presence or absence of mitomycin C (200 ng/ml). NO was consistently generated in the bacteria culture medium during the first 12 h and then reached a plateau (Fig. 1*a*). The growth of the strain EDL933 was not affected by NO during the early and late growth phases (Fig. 1*b*). A dramatic decrease of EHEC growth was observed when bacteria were treated with mitomycin C; this loss of survival was completely inhibited when using NOR-4 (Fig. 1*b*).

NO-Dependent Stx Synthesis Inhibition. We next investigated the effect of NO on *stx2* gene expression and Stx2 production by EHEC. In the culture of EDL933, *stx2* mRNA was poorly expressed at 6 and 12 h of culture but was markedly induced at

Author contributions: A.P.G. designed research; M.V. performed research; T.d.S. and C.M. contributed new reagents/analytic tools; M.V., T.H., C.M., and A.P.G. analyzed data; and A.P.G. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Abbreviations: EHEC, enterohemorrhagic *Escherichia coli*; HUS, hemolytic–uremic syndrome; Stx, Shiga toxin; iNOS, inducible NO synthase; NsrR, nitrite-sensitive repressor; NIL, L-N^6-(1-iminoethyl)lysine.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: agobert@clermont.inra.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0702589104/DC1.

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

MICROBIOLOGY

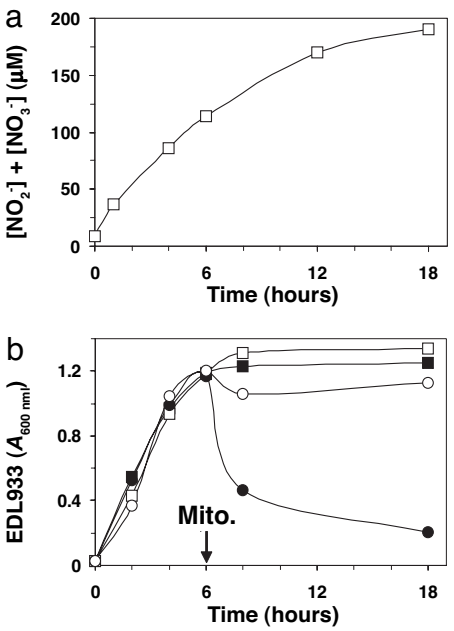


Fig. 1. Kinetics of NO release by NOR-4 and EHEC growth. (*a*) NO_3^- and NO_2^- concentrations determined in LB medium containing 200 μM NOR-4. (*b*) The strain EDL933 was cultured in LB medium with NOR-4 and/or mitomycin C (Mito.). NOR-4 was added at the beginning of the culture, and mitomycin C was added after 6 h. $A_{600\ nm}$ was determined at indicated times. This figure is the representative data of three independent experiments. ■, EDL933; □, + NOR-4; ●, + mitomycin C; ○, + NOR-4 + mitomycin C.

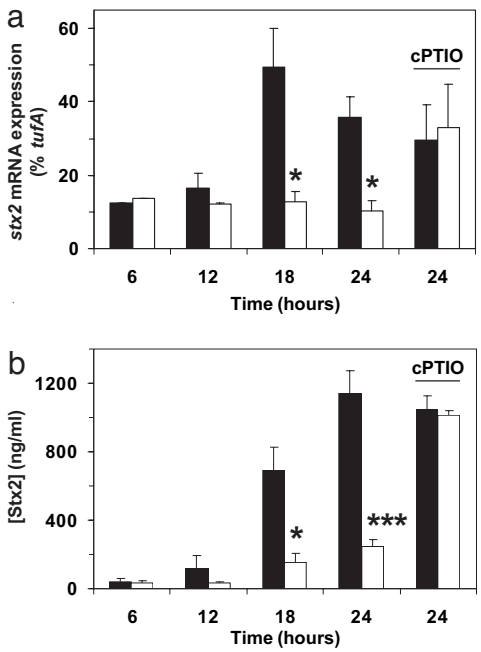


Fig. 2. NOR-4 inhibits *stx2* mRNA expression and Stx2 production by EDL933. The strain EDL933 ($\approx 10^6$ bacteria/ml) was grown in the presence (open bars) or absence (solid bars) of NOR-4, with or without cPTIO. At the indicated times, *stx2* mRNA levels in bacteria and Stx2 concentration in culture supernatants were determined by real-time RT-PCR and ELISA, respectively. Data represent the mean ± SEM of three to seven experiments. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ for EDL933 + NOR-4 vs. EDL933.

18 h and after (Fig. 2*a*); this increase was completely inhibited when 200 μM NOR-4 were added to the EDL933 cultures (Fig. 2*a*). Similarly, Stx2 synthesis was inhibited by ≈4.5-fold at 18 and 24 h when NOR-4 was used (Fig. 2*b*). The use of the NO scavengers cPTIO in NOR-4-treated EHEC cultures restored *stx2* gene expression (Fig. 2*a*) and Stx2 generation (Fig. 2*b*).

To further assess the ability of NO to prevent Stx2 synthesis by EHEC, we stimulated bacteria with mitomycin C in the presence or absence of NOR-4. Addition of mitomycin C to the EDL933 cultures resulted in up-regulation of the *stx2* gene (Fig. 3*a*) and in a large production of Stx2 (Fig. 3*b*). When mitomycin C-treated bacteria were cultured in the presence of 200 μM NOR-4, *stx2* mRNA expression (Fig. 3*a*) and Stx2 generation (Fig. 3*b*) were significantly inhibited by 6.4 ± 1.7- and 2.5 ± 0.9-fold in comparison with EHEC stimulated with mitomycin C, respectively. The expression of the gene *stx2* (Fig. 3*a*) and Stx2 synthesis (Fig. 3*b*) were partially restored by using cPTIO in the NOR-4-treated EDL933 cultures.

We also found that *stx1* was poorly expressed, was not up-regulated under mitomycin C treatment, and was not modulated by NOR-4 (data not shown). However, comparable results were obtained with the EHEC strain 86–24, which expresses only the gene *stx2* (data not shown).

Experiments performed with NOR-3 gave similar results than those obtained with NOR-4 [supporting information (SI) Fig. 7]; however, *stx2* mRNA expression and Stx2 synthesis by EDL933 were not inhibited by 200 μM DEA-NONOate (SI Fig. 7), a NO donor that rapidly releases NO ($[NO_2^-] + [NO_2^-] \approx 200\ \mu$M, 10 min after the addition of DEA-NONOate). In addition, when NOR-4 was preincubated for 24 h in water before use on bacteria, NO was not further released during the experiments and the inhibitory effect on Stx2 synthesis was not observed (data not shown). Importantly, when NOR-4 and mitomycin C were added together to the bacteria, we did not observe the inhibition of *stx2* mRNA expression and of Stx2 synthesis (data not shown); the maximal NO inhibitory effect was observed when mitomycin C was added 6 h after NOR-4.

Finally, to determine whether NO specifically inhibited *stx2* mRNA expression we analyzed the expression of the gene *fliC* encoding the flagellin H7. The expression level of the gene *fliC* and flagellin synthesis were not modified when the bacteria were treated by NOR-4 (SI Fig. 8).

NO-Dependent Decrease of *stx2*-Phage Release. The gene *stx2* of the strain EDL933 is encoded by the phage BP-933W integrated in the bacterial genome. Because NOR-4 inhibits *stx2* mRNA expression, we reasoned that NOR-4 may suppress phage production and release by EHEC. The total phage particles were concentrated from culture supernatants of the strain EDL933 exposed or not to mitomycin C and/or NOR-4. After concentration, the presence of phages was visualized by electronic microscopy in each sample (SI Fig. 9). We then analyzed by PCR (Fig. 3*c*) and real-time PCR (Fig. 3*d*) the presence of the gene *stx2* in the viral genome of each sample. The phages harboring the gene *stx2* were more present in the supernatant of mitomycin C-treated EHEC when compared with the supernatant of bacteria alone; moreover, this induction under mitomycin C treatment was inhibited by 79.2 ± 5.2% when NOR-4 was added to the bacteria (Fig. 3*d*).

NO Down-Regulates *recA* mRNA Expression. RecA activation is a reliable marker of the SOS response that induces the self cleavage of the phage repressors CI (9) and of the *recA* gene repressor LexA (24, 25). To gain further insight in the mechanism by which NO inhibits *stx2* mRNA expression, we therefore analyzed the effect of NOR-4 on *recA* mRNA expression. The expression of the gene was up-regulated by ≈9-fold in mitomycin C-treated EHEC in comparison with untreated bacteria; this

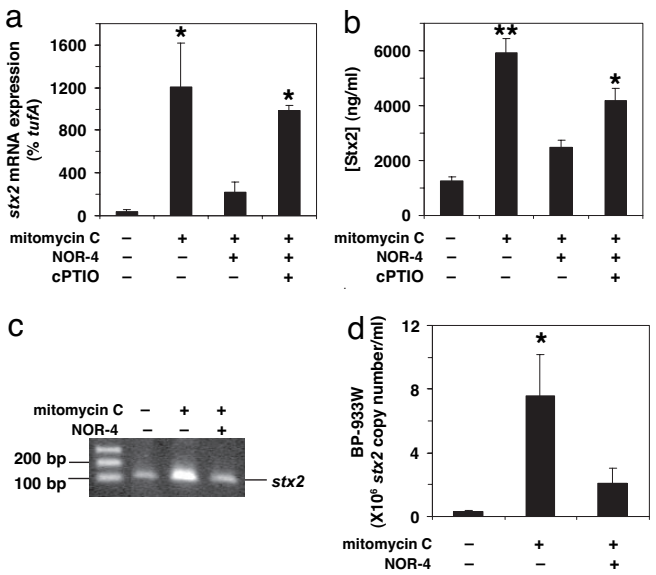


Fig. 3. Effect of NOR-4 in the mitomycin C-induced Stx2 synthesis. (*a* and *b*) The strain EDL933 was treated or not with NOR-4 or cPTIO; mitomycin C was added to the cultures 6 h afterward. The levels of *stx2* mRNA (*a*) and Stx2 concentrations (*b*) were analyzed 2 and 12 h after the mitomycin C treatment, respectively. (*c* and *d*) Phage particles were concentrated from the bacteria supernatants harvested 12 h after mitomycin C treatment. The expression of the gene *stx2* was analyzed by PCR (*c*) and real-time PCR (*d*) from 5 and 1 μl of the phage suspension, respectively. Data represent the mean ± SEM of five (*a* and *b*) and three (*d*) independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ vs. untreated bacteria and bacteria treated with NOR-4.

increase was significantly inhibited by 60% in the presence of NOR-4 (Fig. 4).

Additionally, without mitomycin C treatment, *recA* mRNA expression was decreased by 60.8 ± 1.8% when EDL933 were treated for 18 h with NOR-4 ($P < 0.01$; $n = 4$ experiments).

NsrR Is Implicated in NO-Dependent Regulation of *stx2* Expression. Bacteria detect and respond to NO by a major NO sensor, NsrR. To investigate the implication of this transcriptional repressor in the NO-dependent down-regulation of *stx2* gene expression, we constructed the *nsrR* isogenic mutant in the strain EDL933 and the isogenic mutant transcomplemented with the plasmid pTrc99A harboring the entire *nsrR* gene [EDL933 Δ*nsrR*(pTrc99A-nsrR)]. In the presence or absence of NOR-4, the growth of the three strains was identical (data not shown).

The expression of the gene *stx2* (Fig. 5*a*) and the production of Stx2 (Fig. 5*b*) were not significantly modulated in the Δ*nsrR* and in the Δ*nsrR*(pTrc99A-nsrR) strains in comparison with EDL933 under basal conditions. However, even thought to be not statistically significant, *stx2* mRNA levels in the strain Δ*nsrR* treated with mitomycin C were decreased in comparison with those from EDL933 or Δ*nsrR*(pTrc99A-nsrR) strains stimulated with mitomycin C (Fig. 5*a*). Similarly, under mitomycin C treatment, Stx2 was significantly less produced by the mutant strain when compared with both other strains. Moreover, the inhibitory effect of NO on *stx2* mRNA expression (Fig. 5*a*) and Stx2 production (Fig. 5*b*) by EDL933 was not observed in the strain EDL933 Δ*nsrR*. Similar responses to mitomycin C and/or NOR-4 were observed between the transcomplemented Δ*nsrR* and parental strains (Fig. 5 *a* and *b*).

Concomitantly to *stx2* mRNA expression, *recA* mRNA expression was increased by ≈7- and 2-fold for the strain EDL933 and EDL933 Δ*nsrR* treated with mitomycin C in comparison with untreated cultures, respectively (data not shown).

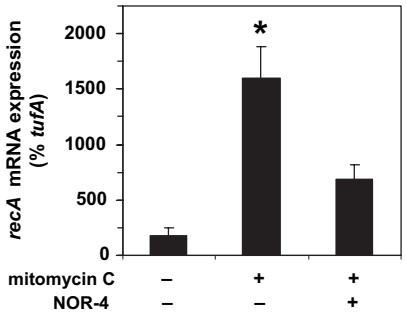


Fig. 4. Analysis of *recA* gene expression. Cultures of EDL933 were treated or not with NOR-4. Mitomycin C was added 6 h afterward. *recA* mRNA levels were analyzed by real-time PCR after 2 h. Values are expressed as the mean ± SEM of three independent experiments. *, $P < 0.05$ vs. both other conditions.

Inhibition of *stx2* Gene Expression by Human Epithelial Cell-Derived NO. We next investigated the effect of NO produced by activated cells on *stx2* expression. We used the human colonic epithelial cell line Hct-8. These cells were first treated with a cytokine mix well known to induce iNOS expression and NO production (16). Then, cells were infected with EDL933 for 18 h in the presence or absence of an iNOS inhibitor, L-N^6-(1-iminoethyl)lysine (NIL). When bacteria were cocultured with cytokines-activated Hct-8 cells, the spontaneous *stx2* gene expression was significantly inhibited when compared with cocultures with unactivated Hct-8 cells; this decrease was reversed by using NIL in the culture of activated cells (Fig. 6*a*). Concomitantly, NO was generated by activated cells but not by control cells or activated cells treated with NIL (Fig. 6*a*).

In an other set of experiments, EHEC were added to control or activated Hct-8 cells for 6 h; then mitomycin C was added and bacteria were harvested 3 h after to analyze the expression of the gene *stx2* (Fig. 6*b*). The *stx2* mRNA levels were significantly increased by 7-fold in the presence of mitomycin C in the cocultures EHEC/Hct-8 cells. This increase was significantly inhibited by ≈55% when bacteria were cocultured with NO producing epithelial cells. We also found that the use of NIL in EHEC/activated Hct-8 cells cocultures completely inhibited NO synthesis and restored *stx2* mRNA expression (Fig. 6*b*).

We confirmed our results by measurement of the cytotoxicity of the strain EDL933 in the different conditions. Without mitomycin C, the strain EDL933 induced a ≈15% cell mortality (SI Fig. 10), that was completely inhibited when Hct-8 cells were pretreated with cytokines. In the presence of mitomycin C, the cytotoxicity of the strain EDL933 on control cells and activated cells was ≈39% and 0%, respectively (SI Fig. 10). Survival was not modified when cells were treated with cytokines or mitomycin C without bacteria. Together, these results establish that in the presence of NO producing enterocytes, i.e., activated cells, Stx production is inhibited and the cytotoxicity is decreased.

Discussion

To limit the production of Stx during EHEC infection represents the ultimate strategy to avoid the development of hemolytic syndromes. In this contribution different approaches have aimed to neutralize Stx by the use of pharmacological compounds (26), specific antibodies (27, 28), or recombinant bacteria expressing globotriaosylceramide-3 (29). Herein, we present NO, a critical mediator of the host mucosal innate immune response, as a potent inhibitor of Stx2 synthesis by EHEC. Our finding has a direct biological relevance, because we show that not only chemical sources of NO, but also activated human epithelial cells-derived NO, inhibits *stx2* gene expression and consequently Stx2 release.

MICROBIOLOGY

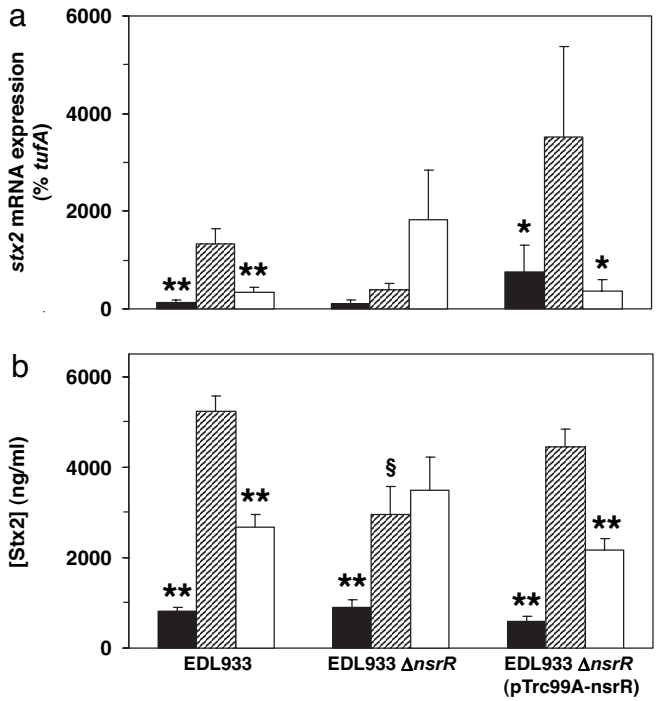


Fig. 5. Modulation of *stx2* gene expression in the Δ*nsrR* strain. The strains EDL933, Δ*nsrR*, and Δ*nsrR*(pTrc99A-nsrR) were cultured alone (plain bars) or treated with mitomycin C (hatched bars) or NOR-4 plus mitomycin C (open bars). *stx2* mRNA expression (*a*) and Stx2 concentration (*b*) were analyzed 2 and 12 h after the mitomycin C addition, respectively. Values are the mean ± SEM of five independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ compared with bacteria treated with mitomycin C; §, $P < 0.05$ vs. EDL933 and EDL933 Δ*nsrR*(pTrc99A-nsrR) in the presence of mitomycin C.

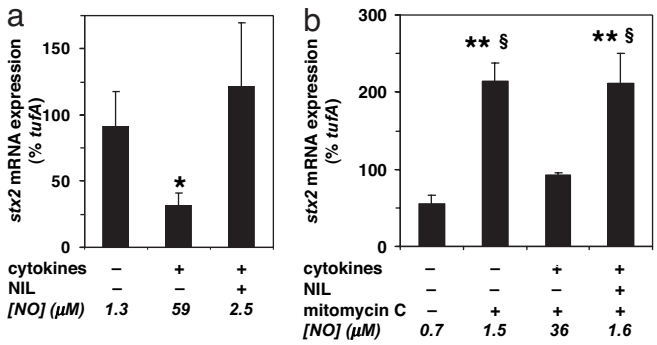


Fig. 6. Activated human epithelial cells inhibit *stx2* gene expression by a NO-dependent mechanism. Human epithelial cells were activated or not with a cytokine mix overnight. Medium was changed, and the strain EDL933 was added to the cells in the presence or absence of NIL. (*a*) The levels of *stx2* mRNA were determined by real-time RT-PCR after 18 h of coculture. Data represent the mean ± SEM of three experiments. *, $P < 0.05$ vs. EDL933 cocultured with unactivated cells. (*b*) Mitomycin C was added 6 h after the beginning of the coculture. The levels of *stx2* mRNA were analyzed 2 h after the mitomycin C treatment. Values are expressed as the mean ± SEM of four independent experiments. **, $P < 0.01$ compared with bacteria cocultured with control cells; §, $P < 0.05$ compared with EDL933 cocultured with activated cells in the presence of mitomycin C. *[NO]* represents the mean of four NO_3^-/NO_2^- concentration measurements performed in supernatants of cells cultured for 18 h (*a*) and 9 h (*b*) without bacteria.

We established that the spontaneous and the mitomycin C-induced activation of RecA and release of Stx2 were inhibited by NO. Previous studies identified RecA as an important contributor to spontaneous induction of phage release and Stx production (30). Thus, we propose that NO inhibited *stx2* mRNA expression in both conditions by a similar mechanism, i.e., the inhibition of RecA activation. Nevertheless, the idea that NO is associated with decreased bacterial SOS response and *stx* gene expression is somewhat unexpected, given that reactive nitrogen species may induce DNA damage. Thus, when used at a high concentration (35 nmol/ml/min vs. ≈0.5 nmol/ml/min in our experiments), NO may act as an inducer of the SOS response in *E. coli* (31); in these conditions, the *recA* deletion leads to a high sensitivity to NO (31), demonstrating that the SOS response is induced and essential to fight the deleterious effects of NO. Nevertheless, "physiological" amounts of NO do not stimulate the SOS response in *Salmonella enterica* because RecA is not essential to prevent NO-dependent bacterial DNA fragmentation (32). Moreover, several transcriptomic analysis of *E. coli* demonstrated that expression of the genes of the SOS response was not enhanced following exposure to NO (18–21). Additionally, we observed that *stx2* mRNA expression was not modulated when bacteria were treated at the same time with mitomycin C and NOR-4. Although this result can be explained by the delay of several hours required to generate significant levels of NO, we suggest that the inhibition of the mitomycin C-induced SOS response and *stx2* gene expression is linked to a long time exposure of EHEC to NO. In support of this hypothesis, we also found that Stx2 production was inhibited in EHEC treated by NO donors with elevated half-life (NOR-3 and NOR-4), but not by DEA-NONOate that releases NO within few minutes.

Investigating the mechanism by which NO suppresses Stx synthesis, we focused on the effect of one of the main bacterial NO sensor, NsrR. Our results indicate that NO signals in EDL933 strain through this sensor to mediate the NO-dependent *stx2* mRNA expression inhibition. Interestingly, we observed that the *nsrR* mutation yields to a decrease of mitomycin C-induced *stx2* gene expression. This information led us to conclude that relieving NsrR DNA-binding activity, either by the effect of NO or by gene deletion, yields to the down-regulation of *stx2* gene expression, and supports the likelihood that NsrR represses genes implicated in BP-933W gene regulation. The identification of the different DNA-binding site of this repressor in the strain EDL933 is therefore underway in our laboratory. Nevertheless, we also envisage that NO may protect EHEC from mitomycin C-induced BP-933W gene expression by interacting with other NO sensor and/or global regulator or by directly modulating protein activity by *S*-nitrosylation.

The innate immune function of NO refers to its ability to modulate inflammatory process and to kill pathogens (17). In our experiments, EHEC killing was not induced by 200 μM NO, as described for *E. coli* or other Gram-negative pathogenic bacteria (31–34). Further, the mitomycin C-induced EHEC killing was reversed by NO, probably because phage synthesis was inhibited by NO, thus limiting bacterial killing. Similarly, it has been shown that the use of glutathione–NO in *E. coli* cultures suppresses the bactericidal effect of hydrogen peroxide and hypochlorous acid (35). Of importance, it has been described that *stx* genes can be horizontally transferred by the phage to commensal *E. coli* (36). Consequently, the phage-susceptible intestinal microbiota can produce Stx and may participate in the pathogenesis of hemolytic syndromes (36, 37). Thus, by inhibiting also the synthesis and the dissemination of the phage particles, NO may exert a collaterally protective effect by reducing the infection of intestinal flora by the *stx*-phage. Additionally, it has been described that Stx plays a function in intestinal colonization by increasing EHEC adherence to enterocytes (38); we thus suggest that NO-mediated Stx synthesis inhibition could result in less host colonization.

Our study has provided insight into the host fighting against EHEC pathogenicity and HUS development. We establish that the host innate immune response represses EHEC virulence, with this particular insight that NO does not directly kill the pathogen but decreases the production of a toxin. Thus, increasing NO production in infected patients, by using NO donor or L-arginine treatment (39), might represent an alternative strategy to limit the development of HUS. Moreover, we propose that differential NO production in infected patients could represent a marker of host susceptibility for EHEC infection.

Materials and Methods

NO Donors, NO Scavengers, and NO Detection. NO was generated by three NO donors, namely DEA-NONOate, NOR-3, and NOR-4 with half-life in PBS, pH 7.4, at 37°C of 2, 30, and 60 min, respectively (see *SI Methods* for chemical formula). The NO scavenger cPTIO (250 μM) was also used. These compounds were purchased from Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland). The concentrations of the stable oxidized products of NO, NO_3^- and NO_2^-, were determined by using the Nitrite/Nitrate Assay Kit (Sigma, St. Louis, MO).

EHEC Strains and Culture Conditions. The EHEC strains EDL933 (40) and 86–24 (41) belonging to the serotype O157:H7 were used. Isolated colony of parental strains or isogenic mutants were grown overnight in LB broth containing kanamycin (50 μg/ml) and/or ampicillin (50 μg/ml) and subcultured (A_{600} = 0.02) in LB medium or used to infect the cells. Cultures were performed in the presence or absence of NO donors, NO scavenger, isopropyl β-D-thiogalactoside (1 mM), and/or mitomycin C (200 ng/ml). When indicated, an aliquot of each culture was harvested and centrifuged 10 min at 10,000 × *g*; the 0.2 μm-filtered supernatants were used for Stx concentration determination and phage purification, and the pellets were used for RNA extraction.

Mutagenesis. Deletion of the *nsrR* gene and insertion of the gene conferring resistance to kanamycin in the strain EDL933 was obtained by using the one-step PCR-based method of Datsenko and Wanner (42). The pKOBEG plasmid expressing the λred recombinases was electroporated into EDL933 strain. Strain *E. coli* K12 CH158 was used as a template to amplify its chromosomal copy of a gene conferring resistance to kanamycin, flanked by *nsrR*-specific sequences. The 5′ ends of the primers (MtnsrR; SI Table 1) contain extension sequences, which consisted of the 50 first or 50 last nucleotides of *nsrR*. Mutants were created by electroporating the host strains carrying pKOBEG with purified linear PCR products and then plating the organisms on selective agar. Allelic exchange was confirmed by PCR analysis and DNA sequencing. The resulting mutants have lost spontaneously the pKOBEG plasmid.

Primers consisting of the first or last nucleotides of the *nsrR* ORF and of the restriction sequence of the enzymes BamHI and EcoRI (CmnsrR; SI Table 1) were used to PCR amplify the *nsrR* gene from genomic DNA of EDL933. Purified PCR products were digested by the relevant enzymes and ligated into the expression vector pTrc99A, conferring resistance to ampicillin, under the control of the isopropyl β-D-thiogalactoside-inducible *trc* promoter. The resulting plasmid (pTrc99A-nsrR) was electroporated into the *nsrR* mutant.

To verify the mutation and the complementation of *nsrR*, we analyzed by semiquantitative RT-PCR the expression of the gene *hmp*, which is repressed by NsrR. The level of *hmp* mRNA was spontaneously increased by ≈50-fold in the Δ*nsrR* strain and was not modified in the Δ*nsrR*(pTrc99A-nsrR) strain in comparison with the parental strain (data not shown).

Cell Cultures and Infections. The globotriaosylceramide-3-positive human colonic epithelial cell line Hct-8 was maintained in DMEM/10% FCS/1% sodium pyruvate/10 mM Hepes/100 units/ml penicillin/100 μg/ml streptomycin at 37°C under 5% CO_2. Cells (10^6 per well) were plated on six-well plates and cultured for 7–10 days until confluence (3×10^6 cells per well). Cells were stimulated for 24 h with a cytokine mix (each obtained from Pierce, Rockford, IL), consisting of human IFN-γ (50 ng/ml), TNF-α (20 ng/ml), and IL-1β (5 ng/ml). Subsequently cells were washed, and a fresh complete medium devoid of antibiotics was added to the cultures, in the presence or absence of the iNOS inhibitor NIL (1 mM) and/or bacteria at a multiplicity of infection of 1.

Bacterial mRNA Analysis. To obtain standard curves for *stx1*, *stx2*, *recA*, and *tufA* genes, we first amplified genomic DNA from EDL933 strain with the primers Sstx1, Sstx2, SrecA, or StufA (SI Table 1) and 0.25 units of AccuTaq DNA polymerase (Invitrogen, Grand Island, NY). PCR products were purified with the Strataprep PCR Purification Kit (Stratagene, La Jolla, CA), and DNA amounts were quantified by measuring A_{260}. PCR products were 10-fold serially diluted from 5×10^8 to 50 molecules/μl and amplified in the LightCycler apparatus (Roche, Mannheim, Germany) by the kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) containing 0.5 μM Estx1, Estx2, ErecA, or EtufA primers used for real-time RT-PCR (SI Table 1). One PCR cycle consisted of the following: 94°C for 30 s, 51°C (Estx1, Estx2, and EtufA) or 57°C (ErecA) for 30 s, and 72°C for 45 s.

Total bacterial RNA was isolated by using TRIzol, and concentration was determined by measuring the A_{260}. Subsequently, 2 μg of RNA from each sample was reverse-transcribed by using random primers and 5 units/μl SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen). Serial dilutions of cDNA were amplified in the LightCycler apparatus in the same conditions as for the standard curves with the primers Estx1, Estx2, EfliC [melting temperature (T_m) = 51°C], ErecA, Ehmp (T_m = 59°C), and EtufA (SI Table 1). The levels of *stx1*, *stx2*, *recA*, and *tufA* mRNA (copy number per nanogram of cDNA) were quantified by noting the fluorescence crossing point of the samples on the corresponding standard curve, and the results are presented as the ratios between the copy number of *stx1*, *stx2*, or *recA* mRNA and the copy number of *tufA* mRNA. For the other genes, results were calculated by using the comparative cycle threshold method in which the amount of target mRNA is normalized to the internal control *tufA*; results are expressed as relative mRNA expression compared with the strain EDL933 cultured alone.

Isolation, Observation, and Quantification of Phage Particles. Phages were purified as described by Fuchs *et al.* with slight modifications (30). Bacteria culture supernatants (5 ml) were filtered by using 0.2-μm filters and incubated with RNase (10 μg/ml) and DNase (40 units/ml) for 30 min at 37°C. Phage particles were pelleted by ultracentrifugation overnight at 76,000 × *g* at 4°C, resuspended in 100 μl of PBS, and used for electronic microscopy and *stx2* gene analysis.

Phage suspensions (10 μl) were placed onto collodion-coated 300 mesh copper grids, negatively stained with 1% phosphotungstic acid for 1 min, and dried. Visualization was performed in a Hitachi (Krefeld, Germany) H-7650 transmission electron microscope at an accelerating voltage of 80 kV.

Phage suspensions (1 μl) were boiled for 5 min at 95°C, and *stx2* was quantified by real-time PCR by using *stx2* or *tufA* primers and the same condition as for mRNA quantification. Moreover, classical PCR was performed with 5 μl of the phage suspension, 0.5 units of AccuTaq (Sigma). One PCR cycle consisted of the following: 94°C for 30 s, 51°C for 30 s, and 68°C for 30 s. The total

MICROBIOLOGY

cycle numbers were 30. A final elongation step of 7 min at 72°C was then used. Absence of bacterial DNA in phage lysates was confirmed by the absence of *tufA* DNA as assayed by PCR and real-time PCR (data not shown).

Analysis of Toxin Production. Stx1 and Stx2 concentrations were measured in bacteria supernatants by ELISA, as described (43).

Immunoblotting. See *SI Methods*.

Cytotoxicity Assay. See *SI Methods*.

Statistics. Student's *t* test was used to determine significant difference when only two treatment groups were being compared. ANOVA with the Student–Newman–Keuls test was used to analyze significant differences among multiple groups.

We thank Annie Garrivier for technical assistance for phage-particle purification and Brigitte Gaillard-Martinie for electronic microscopy. We thank Stephen Spiro for discussions and comments on the results. This work was supported by grants from Institut National de la Recherche Agronomique (to M.V. and T.H.) and from Région Auvergne (to M.V.).

1. Paton JC, Paton AW (1998) *Clin Microbiol Rev* 11:450–479.
2. Garg AX, Suri RS, Barrowman N, Rehman F, Matsell D, Rosas-Arellano MP, Salvadori M, Haynes RB, Clark WF (2003) *J Am Med Assoc* 290:1360–1370.
3. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL (2005) *Lancet* 365:1073–1086.
4. French Multi-Agency Outbreak Investigation Team (2005) *Euro Surveill* 10:E051103.1, www.eurosurveillance.org/ew/2005/051103.asp#1.
5. Maki DG (2006) *N Engl J Med* 355:1952–1955.
6. Strockbine NA, Marques LR, Newland JW, Smith HW, Holmes RK, O'Brien AD (1986) *Infect Immun* 53:135–140.
7. Kimmitt PT, Harwood CR, Barer MR (2000) *Emerg Infect Dis* 6:458–465.
8. Wagner PL, Acheson DW, Waldor MK (2001) *Infect Immun* 69:1934–1937.
9. Koudelka AP, Hufnagel LA, Koudelka GB (2004) *J Bacteriol* 186:7659–7669.
10. Neely MN, Friedman DI (1998) *Mol Microbiol* 28:1255–1267.
11. Makino K, Yokoyama K, Kubota Y, Yutsudo CH, Kimura S, Kurokawa K, Ishii K, Hattori M, Tatsuno I, Abe H, *et al.* (1999) *Genes Genet Syst* 74:227–239.
12. Plunkett G, III, Rose DJ, Durfee TJ, Blattner FR (1999) *J Bacteriol* 181:1767–1778.
13. Yokoyama K, Makino K, Kubota Y, Watanabe M, Kimura S, Yutsudo CH, Kurokawa K, Ishii K, Hattori M, Tatsuno I, *et al.* (2000) *Gene* 258:127–139.
14. Murata A, Shimazu T, Yamamoto T, Taenaka N, Nagayama K, Honda T, Sugimoto H, Monden M, Matsuura N, Okada S (1998) *Cytokine* 10:544–548.
15. Fitzpatrick MM, Shah V, Trompeter RS, Dillon MJ, Barratt TM (1992) *Kidney Int* 42:951–956.
16. Marion R, Coeffier M, Leplingard A, Favennec L, Ducrotte P, Dechelotte P (2003) *Clin Nutr* 22:523–528.
17. Gobert AP, McGee DJ, Akhtar M, Mendz GL, Newton JC, Cheng Y, Mobley HL, Wilson KT (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13844–13849.
18. Mukhopadhyay P, Zheng M, Bedzyk LA, LaRossa RA, Storz G (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101:745–750.
19. Flatley J, Barrett J, Pullan ST, Hughes MN, Green J, Poole RK (2005) *J Biol Chem* 280:10065–10072.
20. Justino MC, Vicente JB, Teixeira M, Saraiva LM (2005) *J Biol Chem* 280:2636–2643.
21. Pullan ST, Gidley MD, Jones RA, Barrett J, Stevanin TM, Read RC, Green J, Poole RK (2007) *J Bacteriol* 189:1845–1855.
22. Rodionov DA, Dubchak IL, Arkin AP, Alm EJ, Gelfand MS (2005) *PLoS Comput Biol* 1:e55.
23. Bodenmiller DM, Spiro S (2006) *J Bacteriol* 188:874–881.
24. Little JW, Edmiston SH, Pacelli LZ, Mount DW (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3225–3229.
25. Little JW, Mount DW, Yanisch-Perron CR (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* 78:4199–4203.
26. Nishikawa K, Watanabe M, Kita E, Igai K, Omata K, Yaffe MB, Natori Y (2006) *FASEB J* 20:2597–2599.
27. Sheoran AS, Chapman-Bonofiglio S, Harvey BR, Mukherjee J, Georgiou G, Donohue-Rolfe A, Tzipori S (2005) *Infect Immun* 73:4607–4613.
28. Wen SX, Teel LD, Judge NA, O'Brien AD (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103:7082–7087.
29. Paton AW, Morona R, Paton JC (2000) *Nat Med* 6:265–270.
30. Fuchs S, Muhldorfer I, Donohue-Rolfe A, Kerenyi M, Emody L, Alexiev R, Nenkov P, Hacker J (1999) *Microb Pathog* 27:13–23.
31. Spek EJ, Wright TL, Stitt MS, Taghizadeh NR, Tannenbaum SR, Marinus MG, Engelward BP (2001) *J Bacteriol* 183:131–138.
32. Schapiro JM, Libby SJ, Fang FC (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8496–8501.
33. Brunelli L, Crow JP, Beckman JS (1995) *Arch Biochem Biophys* 316:327–334.
34. De Groote MA, Granger D, Xu Y, Campbell G, Prince R, Fang FC (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6399–6403.
35. Marcinkiewicz J (1997) *Immunopharmacology* 37:35–41.
36. Gamage SD, Strasser JE, Chalk CL, Weiss AA (2003) *Infect Immun* 71:3107–3115.
37. Gamage SD, Patton AK, Strasser JE, Chalk CL, Weiss AA (2006) *Infect Immun* 74:1977–1983.
38. Robinson CM, Sinclair JF, Smith MJ, O'Brien AD (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103:9667–9672.
39. Gobert AP, Cheng Y, Akhtar M, Mersey BD, Blumberg DR, Cross RK, Drachenberg CB, Boucher JL, Hacker A, Casero RA, Jr, *et al.* (2004) *J Immunol* 173:2109–2117.
40. Perna NT, Plunkett G, III, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, *et al.* (2001) *Nature* 409:529–533.
41. Donnenberg MS, Tzipori S, McKee ML, O'Brien AD, Alroy J, Kaper JB (1993) *J Clin Invest* 92:1418–1424.
42. Datsenko KA, Wanner BL (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6640–6645.
43. Gobert AP, Vareille M, Glasser AL, Hindre T, de Sablet T, Martin C (2007) *J Immunol*, in press.

CHAPITRE 2

NO RÉGULE L'ADHÉSION DES EHEC AUX CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES

INTRODUCTION

Les interactions entre les bactéries pathogènes et le système immunitaire inné sont essentielles pour permettre à l'hôte de lutter contre l'infection. Un des acteurs de la défense non-spécifique des organismes est le NO. Lorsqu'ils sont produits en grande quantité par la iNOS, NO et ses dérivés peuvent être bactériotoxiques/bactériostatiques (Mastroeni P et coll., 2000), peuvent induire des modifications transcriptionnelles dans les bactéries en signalant par des senseurs de NO (Filenko N et coll., 2007; Pullan ST et coll., 2007) ou peuvent provoquer des modifications post-traductionnelles des protéines bactériennes (Shi Q et coll., 2008).

L'effet du NO sur l'expression globale des gènes de *E. coli* a été étudié par l'intermédiaire de puces à ADN (Flatley J et coll., 2005; Pullan ST et coll., 2007). Même si les conditions de culture et les sources de NO entrainent de nombreuses différences de résultats, certains gènes sont systématiquement régulés par NO quelles que soient les conditions expérimentales. De façon non exhaustive, on retrouve des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif et dans la détoxification du NO (Mukhopadhyay P et coll., 2004; Justino MC et coll., 2005). Peu d'études ont cependant montré l'effet du NO sur l'expression de facteurs de virulence. Il a été montré que NO inhibe l'expression de gènes de l'ilot de pathogénicité SPI2, qui code notamment pour un SSTT et permet à *Salmonella enterica* Typhimurium de résister à la phagocytose (McCollister BD et coll., 2005). Cependant, l'effet du NO sur le transcriptome de *E. coli* pathogènes et sur l'expression de facteurs de virulence n'a jamais été étudié à ce jour.

En nous fondant sur les résultats obtenus dans le premier chapitre qui démontrent que NO inhibe la production de Stx2 par les EHEC, nous avons émis l'hypothèse que NO pouvait induire des modifications transcriptionnelles chez les EHEC et moduler l'expression d'autres facteurs de virulence. Nous avons donc utilisé une approche transcriptomique pour déterminer l'effet global du NO sur l'expression de gènes dans la souche EDL933.

Tableau 1: Liste des amorces

Amorces	Séquences (5'-3')
MtgadE-F	ATGATTTTTCTCATGACGAAAGATTCTTTTCTTTTACAGGGCTTTTGGCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
MtgadE-R	CTAAAAATAAGATGTGATACCCAGGGTGACGATGTCGCTCATACGTCTTACATATGAATATCCTCCTTAG
espAlux-F	CGAATACACTACCGTTGTCAGGTTATT[JOE]G
espAlux-R	GCTGGTGATCTGCAAACAGTGA
espBlux-F	CGGACTGCCAACAACAATATCTGAGTC[JOE]G
espBlux-R	TTCGCACGTTGTTCATTAACCT
eaelux-F	CGGAATCTCCTTTACTCAATGCAGTTC[JOE]G
eaelux-R	TTCAATTTGCTGAGAACCACGATT
lerlux-F	CGCAAGTCTGCCCTTCTTCATTG[JOE]G
lerlux-R	TGTGCCTGATGATGGACTCG
gadYlux-F	GACTATCGGGACCGGGAAGAGGATAG[JOE]C
gadYlux-R	CAAAGTTTCCCGTGCCAACAG
gadXlux-F	CGTAAACAGCGTGTCGTATTTCATTTA[JOE]G
gadXlux-R	TGATACTCTGTGGGCGTCATCC
gadElux-F	CAACTGTTACAGGGCTTTTGGCAG[JOE]G
gadElux-R	TTTGATCTCTGACAGGGAATTG
tufAlux-F	CGGCGCGTAGAGATGGTAATGC[FAM]G
tufAlux-R	TCGGGTGGATCAGGGTAACA

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. LES EHEC

Dans ce chapitre, nous avons utilisé la souche EDL933 (EHEC O157:H7 ; cf. chapitre 1) et la souche de référence des EPEC E2348/69 (Levine MM et coll., 1978). Nous avons construit la souche EDL933 Δ*gadE* par la méthode de Datsenko et Wanner (Datsenko KA and Wanner BL, 2000; cf. chapitre 1) en utilisant les amorces Mtgade (Tableau 1). La mutation a été vérifiée par PCR et séquençage. En revanche, nous n'avons pas réussi à complémenter la souche mutante avec le gène *gadE*.

Pour l'analyse de l'expression des gènes du LEE, la souche EDL933 a été cultivée en milieu DMEM-Glutamax-Low Glucose additionné de 10 mM HEPES, pendant une nuit à 37°C sous agitation. La pré-culture a ensuite été diluée dans du milieu frais de façon à obtenir une DO_{600nm} = 0,03 et mise en présence ou absence de NOR-4 (200 ou 500 µM) pendant 3-6 h, à 37°C, sans agitation. Il est important de préciser que nous avons mesuré un pH d'environ 6,8 après 6 h de culture.

II. ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES

J'ai effectué les analyses transcriptomiques au laboratoire de biologie moléculaire du Dr. Josée Harel (GREMIP, Université de Montréal, Canada) dans le cadre d'un projet de collaboration Franco-québécois, en collaboration avec le centre Génome Québec (Université de McGill, Montréal, Canada).

.

II-1. Isolation des ARN

Les ARN ont été isolés grâce au kit RiboPure™-Bacteria (Ambion), selon les recommandations du fournisseur, excepté pour le traitement Dnase 1 qui a été effectué deux fois. La concentration en ARN et sa pureté ont été analysées à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies) et du Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies). La vérification d'une possible contamination ADN a été réalisée en effectuant une amplification du gène *rpoD*, qui code pour une ARN polymérase, sur les différents échantillons par PCR en temps réel sur l'appareil Smart Cycler (Cepheid). Les ARN ont été conservés à -80°C.

II-2. Synthèse des ADNc et biotinylation

Deux aliquotes de 5 µg d'ARN ont été transformés en ADNc en utilisant la SuperScript II et des amorces aléatoires (Invitrogen). Ensuite, 2 µg de RNAse A (Sigma) ont été ajoutés aux ADNc pendant 30 min à 37°C. Les ADNc ont été purifiés à l'aide de filtre Microcon YM-30 (Millipore). La concentration des ADNc et leur pureté ont été mesurées par le Nanodrop ND-100.

Entre 3 et 7 µg d'ADNc ont été fragmentés par 0,5 U de DNAse 1 pendant 10 min à 37°C ; la réaction a été arrêtée en chauffant le mix réactionnel à 98°C pendant 10 min. La fragmentation permet d'obtenir une multitude de petits fragments d'ADNc qui vont pouvoir s'hybrider sur les puces Affymétrix. Les ADNc fragmentés ont ensuite été biotinylés à l'extrémité 3' en utilisant le kit GeneChip DNA Labelling, 7.5 mM (Affymétrix) et 60 U de Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Promega). La réaction a été stoppée en ajoutant 2 µl de 0.5 M EDTA au mix réactionnel. La biotinylation des ADNc fragmentés permettra, par la suite, la détection des fragments hybridés à l'aide de streptavidine.

L'efficacité du marquage à la biotine a été mesurée grâce au kit NeutrAvidin ImmunoPure (Pierce). Une efficacité > 90% est nécessaire pour l'hybridation.

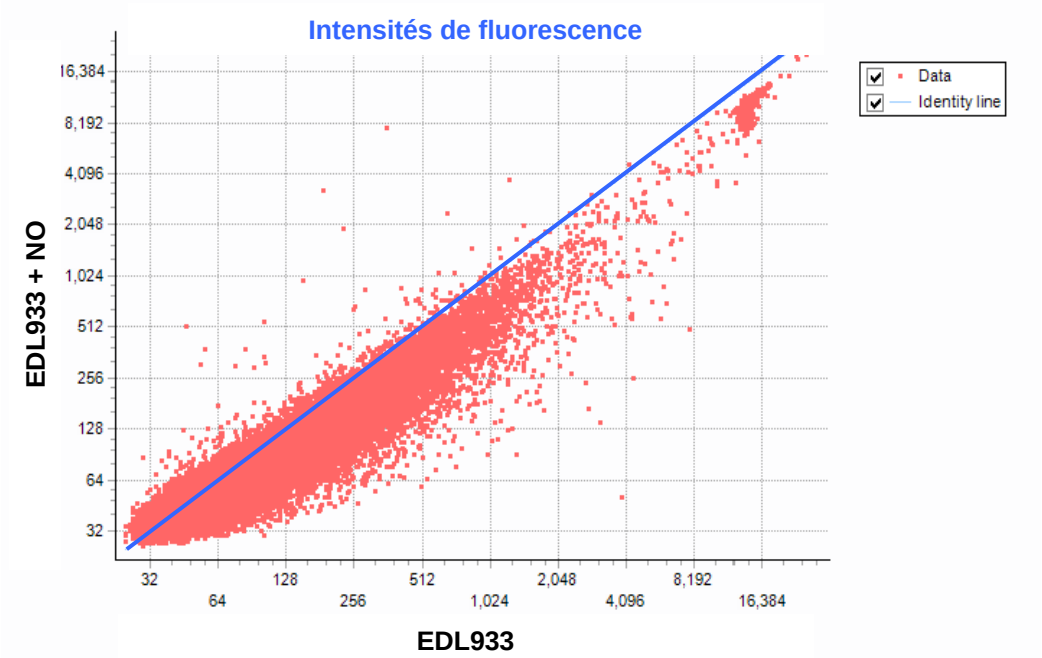
Les expériences ont été réalisées en triplicats.

II-3. Hybridation sur puces Affymétrix et analyse

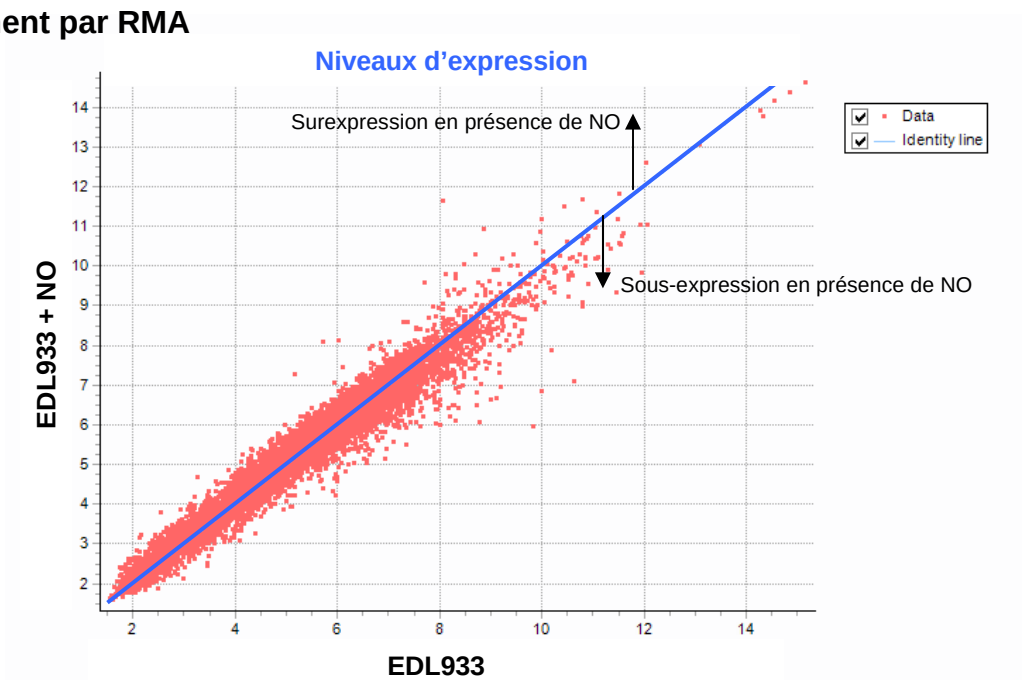
Les puces Affymetrix GeneChip *E. coli* Genome 2.0 (Affymétrix) contiennent environ 10000 groupes de sondes (probesets) représentant les 20366 gènes présents dans les quatre souches de *E. coli* : MG1655, EDL933 (EHEC O157:H7), Sakaï (EHEC O157:H7) et CFT073 (souche uropathogène) et incluent plus de 700 régions intergéniques. Chaque groupe contient 28 sondes de 25 oligomères ; 14 sont spécifiques d'un gène et 14 ont la même séquence que les précédents avec un ou deux oligomères modifiés. Les puces ont été réalisées à partir des bases de données ASAP (*E. coli* Genome Project ; University of Wisconsin-Madison) et NCBI. La base de données ASAP a fourni la séquence et les annotations sur la souche K12 (version m56) et la souche EDL933 (version vers1). Les bases de données NCBI ont fourni les informations sur les séquences de la souche Sakaï et la souche CFT073. L'hybridation a été réalisée au Centre Génome Québec (McGill University, Montréal, Canada). L'intensité obtenue correspond à l'ensemble des intensités obtenues pour chaque groupe de sondes à laquelle est soustrait le bruit de fond (14 sondes avec erreurs).

Figure 1: Exemple de normalisation des données d'intensité des puces Affymétrix par l'algorithme RMA

Données brutes



Après traitement par RMA



Il existe différentes sources de variabilité liées à la technologie des puces à ADN. Elles rendent difficile la mise en relation entre les intensités mesurées lors de l'analyse d'images et les niveaux d'expression des gènes. L'objectif de la normalisation est de réaliser une transformation des intensités mesurées pour permettre l'étude des niveaux d'expression des gènes. Elle rend alors possible la comparaison entre plusieurs puces à ADN.

Les données ont été traitées par le logiciel FlexArray 1.1 (Miron M et coll., 2006). L'algorithme RMA (robust multiarray average algorithm; Irizarry RA et coll., 2003) a été utilisé pour normaliser les données (Fig. 1). L'analyse statistique a été réalisée grâce au test EB de Wright and Simon. Le niveau d'expression des gènes a été obtenu à partir de trois réplicats indépendants dans chaque condition. Enfin, les gènes ont été classés selon leur fonction à l'aide du site EcoCyc (http://biocyc.org/ECOO157/).

III. QUANTIFICATION DES ARNm

III-1. Extraction des ARN totaux

Les ARN bactériens ont été extraits par la méthode d'extraction au TRIzol. Le protocole est détaillé dans le chapitre 1.

III-2. Transcription inverse des ARN

Les ARN (2 µg) ont été rétro-transcrits en utilisant 30 ng/µl d'amorces Random Primers, 0,5 mM de chaque dNTP, 10 mM de DTT et 5 U/µl de SuperScript II Reverse Transcriptase. La réaction s'est déroulée pendant 50 min à 42 °C puis l'enzyme a été inactivée à 70 °C pendant 15 min. Tous les réactifs nécessaires à la transcription inverse ont été obtenus chez Invitrogen.

III-3. PCR semi-quantitative

L'analyse de l'expression des gènes *espA, espB, ler, eae, gadY, gadX* et *gadE* a été réalisée par PCR en temps réel multiplex à l'aide de la technologie Lux (Invitrogen). Les amorces espAlux, espBlux, eaelux, lerlux, gadYlux, gadXlux ou gadElux sont couplées au fluorochrome JOE (540 nm, Invitrogen) et l'amorce tufAlux est couplée au fluorochrome FAM (520 nm, Invitrogen) (Tableau 1).

Les ADNc (2 µl) ont été amplifiés par le kit Premix Ex *Taq* kit (Lonza), en présence de 0,5 µM des amorces des gènes cibles et 0,5 µM des amorces tufAlux, dans l'appareil Mastercycler ep Realplex Silver apparatus (Ependorf). Les niveaux d'expression des ARNm des gènes *espA, espB, ler, eae, gadY, gadX* et *gadE* ont été normalisés par rapport au contrôle interne *tufA* et par rapport à une condition basale (souche EDL933 cultivée seule) en utilisant la méthode comparative du seuil de fluorescence. Les résultats sont présentés en tant qu'expression relative du gène cible/EDL933.

IV. DÉTECTION DES PROTÉINES

IV-1. Extraction des protéines

Les cultures bactériennes (4 ml) ont été centrifugées à 10000 g pendant 10 min. Le surnageant a été récupéré et 4 ml de TCA 10% ont été ajoutés. Après une incubation à 4°C pendant une nuit, les échantillons ont été centrifugés et lavés à l'éthanol absolu. Les culots ont été repris dans du tampon de Laemmli, bouillis pendant 5 min et utilisés pour le Western-blot.

IV-2. Western-blot

Les échantillons ont été séparés sur gel de polyacrylamide 10%-SDS. Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose sous l'action d'un champ électrique. La membrane a ensuite été saturée par une solution de PBS-lait écrémé 5%-Tween 0,1% et hybridée pendant une nuit à 4°C avec un anticorps polyclonal de poulet dirigé contre EspA, EspB ou Eae. Les Ac anti-EspA, EspB, Eae ont été fournis par Josée Harel (GREMIP, Université de Montréal, Canada). Après 3 lavages en PBS-Tween 0,5%, la membrane a été incubée avec un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de poulet couplé à la peroxydase (Pierce) pendant 1 h à température ambiante. La détection chimioluminescente a été réalisée par le kit ECL Western Blotting Substrate (Pierce).

V. ANALYSE DES INTERACTIONS BACTÉRIES/CELLULES ÉPITHÉLIALES

V-1. Visualisation de l'adhérence bactérienne

Les cellules Hct-8 ont été cultivées en LabTek (Nunc ; 10^5 cellules/puits) puis ont été stimulées ou non par les cytokines IFN-γ, TNF-α et IL-1β pendant 24 h afin d'induire la production de NO. Les cellules ont ensuite été lavées et infectées avec la souche EDL933, EDL933 Δ*gadE* ou la souche EPEC E2348/69 avec une MOI de 10, en présence ou absence de NOR-4 (200 µM et 500 µM), pendant 6 h. Après plusieurs lavages en PBS froid, les cellules ont été fixées avec 1 ml de méthanol pendant 10 min à –20°C et colorées par une solution de Giemsa 10% pendant 20 min (Sigma).

V-2. Mise en évidence des lésions A/E

Les lésions A/E induites par les bactéries ont été mises en évidence par le FAS (pour fluorescent-actin staining) test. Les cellules Hct-8 ont été cultivées, stimulées et infectées comme ci-dessus. Après lavage, les cellules ont été fixées au formaldéhyde 3% pendant 5 min

et traitées par une solution de glycine 0,1 M (Sigma). Les cellules ont été ensuite perméabilisées au triton X100 0,1% pendant 20 min et saturées par une solution de Gélatine 0,2% pendant 5 min. Le marquage a été réalisé à l'aide de phalloïdine marquée au FITC (1 µg/ml, Sigma) pendant 20 min à l'obscurité. Les cellules ont été observées au microscope à fluorescence (Axioplan 2E, Zeiss).

VI. ANALYSES STATISTIQUES

Les données obtenues sont présentées en tant que moyenne ± erreur standard à la moyenne. L'analyse statistique a été réalisée par un test *t* de Student quand seulement deux groupes ont été comparés. Les échantillons ont été considérés comme non appariés. Une analyse de variance avec le test de Student-Newman-Keuls a été effectuée pour analyser les différences significatives entre plus de deux groupes.

Tableau 2: Gènes surexprimés par NO

Fonction	Gène	Produit	Expression/EDL933	*P* (vs. EDL933)	Opéron
Structure de la cellule					
	oppA	oligopeptide transport; periplasmic binding protein	1.65	2.28E-04	*oppABCDF*
	oppC	homolog of Salmonella oligopeptide transport permease protein	1.64	2.54E-03	
	oppD	oligopeptide transporter ATP-binding component	1.59	1.86E-02	
	rmf	ribosome modulation factor	1.54	3.14E-03	
Métabolisme central intermédiaire					
	aceA	isocitrate lyase	2.15	8.14E-04	*aceBAK*
	aceB	malate synthase A	2.25	3.18E-03	
	aceK	isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase	1.73	8.30E-04	
	aspA	aspartate ammonia-lyase (aspartase)	1.59	2.90E-02	
	betA	choline dehydrogenase, a flavoprotein	1.83	8.38E-04	*betIBA*
	betI	probably transcriptional repressor of bet genes	1.52	2.16E-02	
	sthA	subunit of pyridine nucleotide transhydrogenase	1.49	9.79E-03	
	speF	ornithine decarboxylase isozyme, inducible	2.75	2.05E-04	*speF potE*
Production d'énergie/ Transport					
	appC	probable third cytochrome oxidase, subunit I	1.95	4.42E-03	*appCBA*
	appB	probable third cytochrome oxidase, subunit II	1.54	7.28E-03	
	appA	phosphoanhydride phosphorylase; pH 2.5 acid phosphatase	1.71	3.72E-03	
	cyoA	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II	2.23	1.38E-04	*cyoABCDE*
	cyoB	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	2.04	3.62E-05	
	cyoC	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III	1.98	5.05E-04	
	cyoD	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit IV	2.10	2.28E-03	
	napA	probable nitrate reductase 3	2.51	1.20E-03	*napFDAGHBC ccmA-H*
	napF	periplasmic nitrate reductase	1.53	1.33E-03	
	nrfA	periplasmic nitrite reductase	2.40	1.21E-04	*nrfABCD*
	nrfB	formate-dependent nitrite reductase; a penta-haeme cytochrome c	1.61	1.77E-02	
	nuoA	NADH dehydrogenase alpha subunit	1.82	1.24E-03	*nuoABCDGH-N*
	nuoB	NADH dehydrogenase beta subunit	1.83	1.39E-03	
	nuoC	NADH dehydrogenase I chain C, D	1.96	3.45E-05	
	nuoG	NADH dehydrogenase I chain G	1.71	8.61E-03	
	sdhA	succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit	2.48	3.66E-05	*sdhCDAB Z0879 sucABC*
	sdhB	succinate dehydrogenase, iron sulfur protein	2.93	9.21E-06	
	sdhC	succinate dehydrogenase, cytochrome b556	2.89	3.10E-04	
	sdhD	succinate dehydrogenase, hydrophobic subunit	2.73	3.27E-06	
	Z0879	hypothetical protein	3.70	1.61E-05	
	sucA	2-oxoglutarate dehydrogenase	3.52	3.09E-06	
	sucB	2-oxoglutarate dehydrogenase	4.23	1.09E-06	
	sucC	succinyl-CoA synthetase, beta subunit	2.58	4.96E-05	
	sucD	succinyl-CoA synthetase, alpha subunit	2.07	1.69E-04	
	gltA	citrate synthase	1.51	4.08E-03	
Métabolisme du carbone					
	tnaA	tryptophanase	3.97	2.56E-07	
	tnaB	low affinity tryptophan permease	4.32	8.81E-05	
	tnaL	tryptophanase leader peptide	2.50	2.07E-03	
	fdoG	formate dehydrogenase-O, major subunit	1.69	1.67E-03	*fdoGHIE*
	fdoH	formate dehydrogenase-O, iron-sulfur subunit	1.88	1.73E-03	
	fdoI	formate dehydrogenase, cytochrome B556 (FDO) subunit	1.74	9.54E-03	
	fdhE	formate dehydrogenase accessory protein	1.54	5.26E-03	
	fumA	fumarase A	1.63	2.11E-02	
	hyaA	hydrogenase-1 small subunit	1.53	8.71E-03	*hyaABCDEF*
	hyaB	hydrogenase-1 large subunit	2.06	1.49E-03	
	hyaC	probable Ni/Fe-hydrogenase 1 b-type cytochrome subunit	1.76	9.24E-04	
	hyad	processing of HyaA and HyaB proteins	1.93	1.69E-03	
	hyaE	processing of HyaA and HyaB proteins	1.66	4.96E-03	
	hyaF	nickel incorporation into hydrogenase-1 proteins	1.72	4.70E-03	
Régulateurs					
	flhC	regulator of flagellar biosynthesis acting on class 2 operons	1.67	2.38E-02	*flhDC*
	flhD	regulator of flagellar biosynthesis, acting on class 2 operons	1.96	6.40E-03	
	lsrR	putative transcriptional regulator	1.61	1.45E-03	
	gadW	transcriptional repressor	1.58	2.12E-02	
	gadE	transcriptional repressor	1.53	8.37E-02	
Transport					
	ybhS	putative ABC transporter	1.51	2.38E-02	*ybhHGFSR*
	ssuB	aliphatic sulfonate ABC transporter	1.81	9.25E-04	
	tdcB	threonine dehydratase, catabolic	1.90	5.63E-03	*tdcBCDE yhaR*
	dctA	dicarboxylate DAACS transporter	2.45	7.76E-05	
Détoxification					
	hcp	putative prismane HCP protein	1.53	1.08E-02	*hcp hcr*
	hcr	Oxidoreductase FAD-binding region	1.32	6.86E-03	
	hmpA	flavohemoprotein	1.30	3.20E-02	
Adaptations					
	msrB	methionine sulfoxide reductase B	1.87	8.82E-04	
ARN					
	gadY	small RNA, positive gadX regulator	2.05	3.73E-02	*gadYX*
	ryeA	small RNA that interacts with Hfq	2.02	2.13E-03	
Inconnu					
	yjiX	Unknown function	2.13	5.19E-04	
	yjiY	putative carbon starvation protein	3.07	2.06E-06	
	z3391	putative glutathione-S-transferase (absent in K12)	1.69	5.08E-03	
	yadB	putative tRNA synthetase	1.90	2.53E-03	*dksA yadB*
	Z3065	hypothetical protein	3.06	1.90E-05	
	ylaC	predicted inner membrane protein	1.73	3.61E-03	
	yliH	regulator of biofilm formation	1.74	2.82E-02	
	z1190	putative glucosyltransferase	1.58	4.91E-02	
	ydcH	hypothetical protein	1.99	9.30E-03	
	yciN	Unknown function	1.75	2.19E-03	

RÉSULTATS

I. LE TRANSCRIPTOME DES EHEC EN RÉPONSE AU NO

Nous avons étudié l'effet global de 200 µM de NO sur les EHEC en comparant les transcriptomes de la souche EDL933 traitée ou non par NO. Nous avons retenu les gènes dont l'expression a été modulée au moins 1,5 fois avec $P < 0,05$.

I-1. Induction de gènes par NO

Les résultats indiquent que 78 gènes ont été induits en présence de NO (Tableau 2). On retrouve ainsi des gènes impliqués dans la détoxification du NO, codant pour : *i*) les NO_3^- et NO_2^- réductases périplasmiques Nap et Nrf, tandis que les gènes codant les enzymes Nir et Nar qui sont cytoplasmiques n'ont pas été induits par NO, *ii*) la flavohémoglobine Hmp, et *iii*) le sytème Hcp-Hcr, dont l'expression est régulée par NsrR mais dont le mécanisme précis de détoxification du NO reste méconnu (Filenko N et coll., 2007).

Le groupe de gènes le plus surexprimé en réponse au NO est celui codant pour la tryptophanase. Les gènes *tnaL*, *tnaA* et *tnaB* forment un opéron dans *E. coli* K12 mais pas chez EDL933. La tryptophanase convertit le tryptophane en pyruvate et en indole. Des études ont montré que l'indole pouvait se substituer aux acyl-homosérine-lactones pour activer SdiA et le quorum sensing (Lee J et coll., 2007).

Le plus grand opéron ayant été entièrement induit par NO est l'opéron *sdh-suc*. Cet opéron code pour une succinate déshydrogénase, une 2-oxoglutarate déshydrogénase et une succinyl-CoA synthétase.

Enfin, il est intéressant de noter que les gènes de régulation du système de résistance à l'acidité Gad, *gadY*, *gadW* et *gadE*, ont été surexprimés par NO. L'expression de *gadX* n'a pas été modifiée ; les gènes *gadA* et *gadB* ont été respectivement induits 1,3 ($P = 0,04$) et 1,2 ($P = 0,8$) fois.

I-2. Répression de gènes par NO

D'autre part, 111 gènes ont été sous-exprimés lors du traitement par NO (Tableau 3). Parmi ceux-ci on trouve les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la biosynthèse des

Tableau 3: Gènes sous-exprimés par NO

Fonction	Gène	Produit	Expression/EDL933	*P* (vs. EDL933)	Opéron
Métabolisme	glpD	G3PDH	0.18	1.37E-04	
	aceE	pyruvate dehydrogenase (decarboxylase component)	0.43	2.68E-03	
	cdd	cytidine/deoxycytidine deaminase	0.46	4.88E-03	
	Z3198	GDP-mannose dehydratase	0.69	2.40E-02	
	yfiD	putative formate acetyltransferase	0.28	2.59E-05	
	ndh	respiratory NADH dehydrogenase	0.40	2.58E-06	
	udp	uridine phosphorylase	0.66	7.38E-03	
	carA	carbamoyl-phosphate synthetase	0.24	3.68E-06	*carAB*
	carB	carbamoyl-phosphate synthase large subunit	0.36	1.35E-05	
Biosynthèse des purines	purE	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	0.61	2.28E-03	*purEK*
	purK	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	0.63	2.47E-03	
	purH	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase	0.56	2.36E-04	*purHD*
	purM	phosphoribosylaminoimidazole synthetase	0.53	5.23E-04	*purMN*
	purN	phosphoribosylglycinamide formyltransferase 1	0.50	5.33E-04	
	purT	phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2	0.58	1.76E-04	
	purF	transcriptional repressor for pur regulon	0.48	9.98E-04	
	purC	SAICAR synthetase	0.39	4.95E-05	
Métabolisme des polyamines	Z2570	hypothetical protein	0.47	2.19E-04	Z2570 *speG*
	speG	spermidine N1-acetyltransferase	0.49	1.22E-04	
	cadB	transport of lysine/cadaverine	0.60	9.32E-03	*cadCBA yjdL lysU*
	cadA	lysine decarboxylase 1	0.65	4.88E-03	
	speB	agmatinase	0.59	7.11E-03	*speA* Z4282 *speB*
Métabolisme des entérocholines	entC	isochorismate hydroxymutase 2	0.35	1.35E-04	*entCEBA ybdB cstA*
	entE	2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase	0.28	3.60E-05	
	entB	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate synthetase	0.46	4.76E-04	
	exbD	uptake of enterochelin and colicins	0.28	1.31E-05	
Métabolisme de l'hème	chuA	outer membrane heme/hemoglobin receptor	0.54	1.27E-04	*chuAS*
	chuS	heme oxygenase	0.65	3.07E-03	
	chuW	putative oxygen independent coproporphyrinogen III oxidase	0.53	1.77E-04	*chuTWXYU*
	hemH	ferrochelatase: final enzyme of heme biosynthesis	0.42	1.29E-03	
Réponse au stress	oxyS	oxyR RNA regulator	0.04	6.48E-06	
	grxA	glutaredoxin1 redox coenzyme for ribonucleotide reductase	0.06	2.08E-07	
	katG	catalase; hydroperoxidase	0.12	1.46E-08	
	ahpF	alkyl hydroperoxide reductase, F52a subunit	0.12	8.48E-09	
	pmrD	polymyxin resistance protein B	0.38	9.02E-05	
	trxB	thioredoxin reductase	0.65	1.98E-03	
	trxC	putative thioredoxin-like protein	0.32	7.97E-05	
	ahpC	alkyl hydroperoxide reductase, C22 subunit	0.27	1.54E-07	
	gor	glutathione oxidoreductase	0.45	5.26E-05	
Hsp	ibpB	heat shock protein	0.33	4.09E-04	
	clpB	heat shock protein	0.57	3.67E-04	
	hslJ	heat shock protein	0.40	3.62E-05	
	hslV	EDL	0.42	2.71E-03	
Chaperonnes	ibpA	chaperone	0.23	3.43E-06	
	Z2201	putative fimbrial chaperone protein	0.49	4.04E-04	
	grpE	cochaperone	0.43	7.73E-05	
Récepteurs	Z1178	putative receptor	0.59	3.35E-04	
	Z3272	putative outer membrane protein	0.60	1.85E-02	
	Z2220	putative sensor kinase	0.42	1.57E-03	
	fhuA	outer membrane protein receptor	0.24	1.60E-06	
Régulateurs	phoP	two-component regulatory system phoQ/phoP	0.50	6.59E-04	*purB phoPQ*
	phoQ	Sensor of the two-component regulatory system phoQ/phoP	0.58	1.14E-02	
	ybeZ	putative ATP-binding protein in pho regulon	0.59	7.65E-03	
	yedV	putative 2-component sensor protein	0.65	3.63E-02	*ydeVWK*
	yedW	putative 2-component transcriptional regulator	0.62	2.25E-02	
	FxsA	Suppressor of F exclusion of phage T7	0.45	2.04E-03	
	hycA	transcriptional repression of hyc and hyp operons (fhlA)	0.50	1.19E-04	
	dps	global regulator	0.45	4.66E-04	
	zntR/yhdM	putative transcriptional regulator	0.46	2.47E-04	
	pdhR	transcriptional regulator for pyruvate dehydrogenase complex	0.49	1.04E-03	
Virulence	espA	secreted protein	0.32	5.31E-05	LEE4: *sepL espA espD espB-*
	espD	secreted protein	0.53	1.86E-03	*-cesD2 escF* Z5102 espF
	espB	secreted protein	0.65	9.90E-03	
	Z5102	Unknown function	0.59	1.05E-02	
	sepL	type III secretion system	0.65	5.59E-03	
	Z2053	putative intestinal colonization factor (prophage CP-933O)	0.65	8.58E-03	
Plasmid F	Protein-A-w		0.36	7.02E-06	
	Protein-B-w		0.24	2.17E-05	
Inconnu	thdF	GTP-binding protein in thiophene and furan oxidation	0.62	2.27E-02	
	cvpA	membrane protein required for colicin V production	0.46	6.38E-05	
	yheA	Bacterioferritin-associated ferredoxin	0.32	9.26E-04	
	hydN	involved in electron transport, Fe-S centers	0.50	1.77E-04	
	yaaA	hypothetical protein	0.49	3.57E-04	
	ybeO	Unknown function	0.45	1.47E-02	
	yhdL	Unknown function	0.46	2.60E-04	
	ybeD	unknown functions	0.37	1.34E-03	
	ycfJ	hypothetical protein	0.49	3.79E-04	
	yhdN	hypothetical protein	0.43	4.17E-04	
	yhgG	hypothetical protein	0.65	3.64E-02	
	Z4775	Unknown function	0.65	4.48E-02	
	Z3919	Unknown function	0.67	2.69E-02	
	Z0726	hypothetical protein	0.45	1.69E-03	
	Z2573	hypothetical protein	0.66	1.79E-03	
	Z2872	hypothetical protein	0.26	8.96E-04	
	Z5852	Unknown function	0.62	1.55E-02	
	Z4854	putative acyl carrier protein	0.64	2.75E-02	
	Z3062	Belongs to the transthyretin family	0.46	1.67E-05	

purines et le métabolisme des polyamines, de l'hème et des entérochélines. En revanche, peu de gènes codant pour des protéines productrices d'énergie ont été sous-exprimés.

Par ailleurs, l'expression de nombreux régulateurs transcriptionnels, dont les systèmes à deux composantes PhoP/Q et YdeV/W, a été inhibée par NO.

Cependant, il est étonnant d'avoir mis en évidence des gènes codant pour des protéines Hsp (pour heat shock protein), des chaperons et des facteurs de résistance au stress, dont plus particulièrement OxyS.

De façon intéressante, l'expression de la plupart des gènes de l'opéron du LEE4 a été inhibée de façon significative par NO. Ce dernier résultat nous a conduit à rechercher l'effet du NO sur l'expression de tous les gènes du LEE (Fig. 2). En effet, certains gènes n'ont pas été mis en évidence dans notre analyse car leur expression n'a pas été modifiée au moins 1,5 fois ou a été modulée de façon non significative. Nos données montrent que les premiers gènes du LEE1, incluant *ler*, ont été réprimés de façon non significative par NOR-4 ; en revanche, l'expression des gènes *escR*, *escS*, *cesT* et *escU* n'a pas été affectée par NO. De la même manière, l'expression des LEE2 et LEE3 n'a globalement pas été modulée par NO. En revanche, le LEE5 a été réprimé en présence de NO.

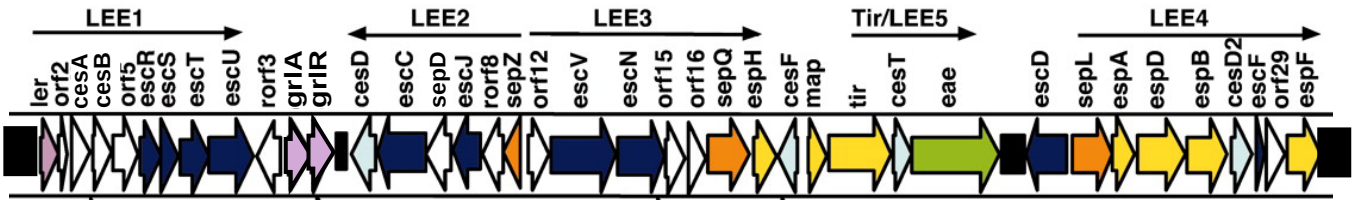
Parmi toutes ces données obtenues par cette analyse transcriptomique, nous avons ciblé notre attention sur deux résultats précis : l'induction du système Gad et l'inhibition de l'expression de LEE4/5. En effet, il a été montré que GadE et GadX sont des répresseurs transcriptionnels des gènes du LEE chez les EHEC et les EPEC (Shin S et coll., 2001; Tatsuno I et coll., 2003).

II. NO INHIBE L'EXPRESSION DES GÈNES DU LEE

Afin de vérifier les résultats obtenus par puces à ADN, nous avons analysé l'effet du NO sur l'expression des gènes *ler* (LEE1), *espA* et *espB* appartenant au LEE4, et *eae* (LEE5) par PCR en temps réel. Nous avons travaillé en milieu DMEM car l'expression du LEE y est maximale en comparaison du MLB (Abe H et coll., 2002).

En présence de 200 et 500 µM de NO, l'expression des gènes *espA*, *espB* et *eae* a été significativement réprimée par rapport à la souche non traitée en milieu DMEM (Fig. 3A) ; cette répression a été retrouvée en MLB (résultats non montrés). L'expression relative du gène *ler* a été réprimée d'environ 70% par rapport à EDL933 non traitée en réponse à 500 µM

Figure 2: Modulation du LEE par NO



LEE1

Gène	*ler*	Z5139	*cesA*	*cesB*	Z5136	*escR*	*escS*	*cesT*	*escU*
Expression	0,87	0,69	0,63	0,73	0,82	1,11	1,11	1,22	0,93
P	*0,06*	*0,2*	*0,1*	*0,06*	*0,5*	*0,35*	*0,51*	*0,14*	*0,9*

LEE2

Gène	Z5131	*grlA*	*grlR*	*cesD*	*escC*	Z5125	*escJ*	Z5123	*sepZ*
Expression	0,92	0,71	0,88	0,94	0,94	0,85	0,72	1,12	0,63
P	*0,53*	*0,01*	*0,21*	*0,91*	*0,21*	*0,33*	*0,01*	*0,62*	*0,006*

LEE3

Gène	Z5121	*escV*	*escN*	*Z5118*	*Z5117*	*sepQ*	*espH*	*cesF*	*map*
Expression	0,91	0,87	1,10	0,82	1,13	0,83	0,92	0,91	0,91
P	*0,91*	*0,45*	*0,62*	*0,11*	*0,35*	*0,35*	*0,32*	*0,33*	*0,38*

LEE5

Gène	tir	*cesT*	*eae*	*escD*
Expression	0,71	0,51	0,82	1,02
P	*0,02*	*0,06*	*0,07*	*0,82*

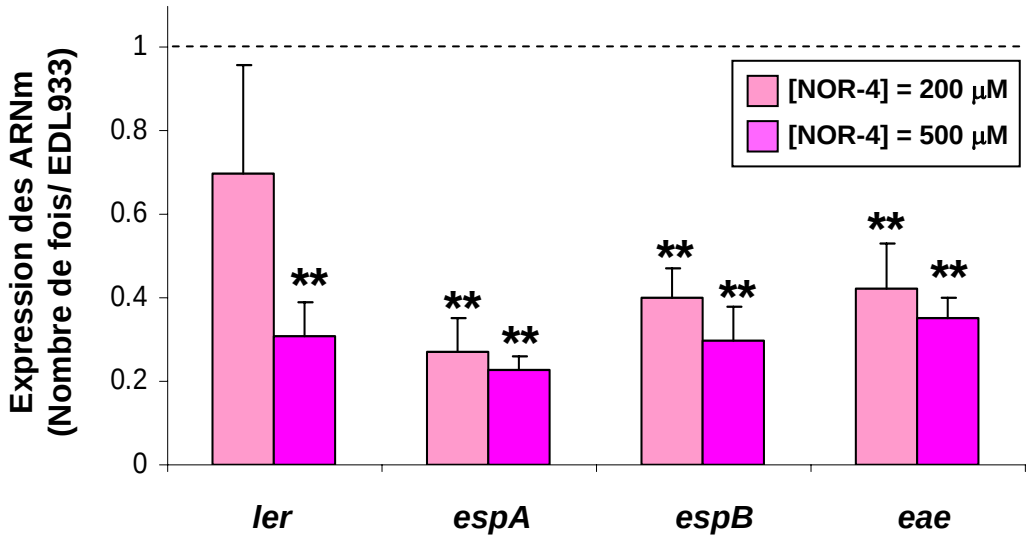
LEE4

Gène	*sepL*	*espA*	*espD*	*espB*	*cesD2*	*escF*	Z5102	*espF*
Expression	0,65	0,32	0,53	0,65	0,68	0,75	0,59	0,83
P	*0,006*	*0,0005*	*0,0018*	*0,009*	*0,04*	*0,1*	*0,01*	*0,2*

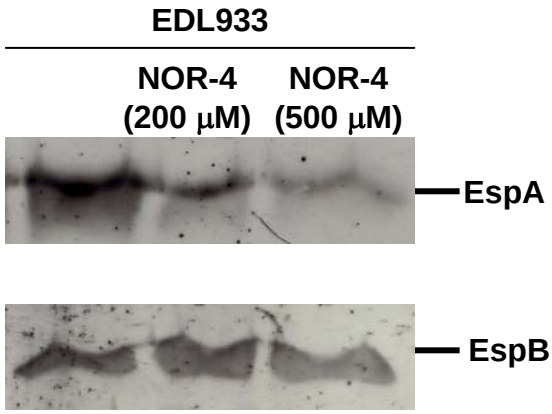
La souche EDL933 a été incubée pendant 6 h en présence ou non de NOR-4 200 µM. Les ARN ont été extraits et hybridés sur puces à ADN de type Affymétrix. Le niveau d'expression de chaque gène dans la souche EDL933 + NOR-4 par rapport à la souche EDL933, obtenu à partir de n = 3, est donné.

Figure 3: NO inhibe l'expression de gènes du LEE des EHEC

A

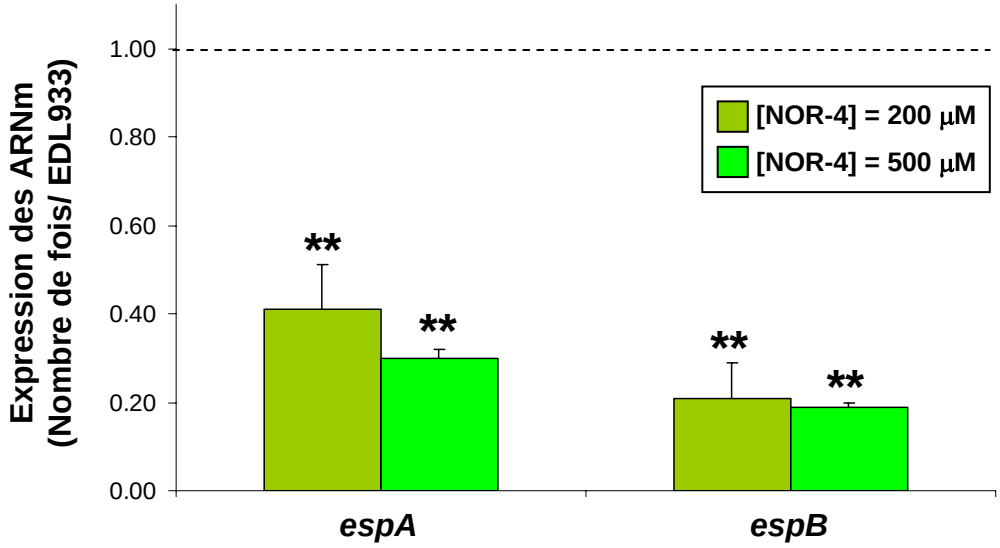


B



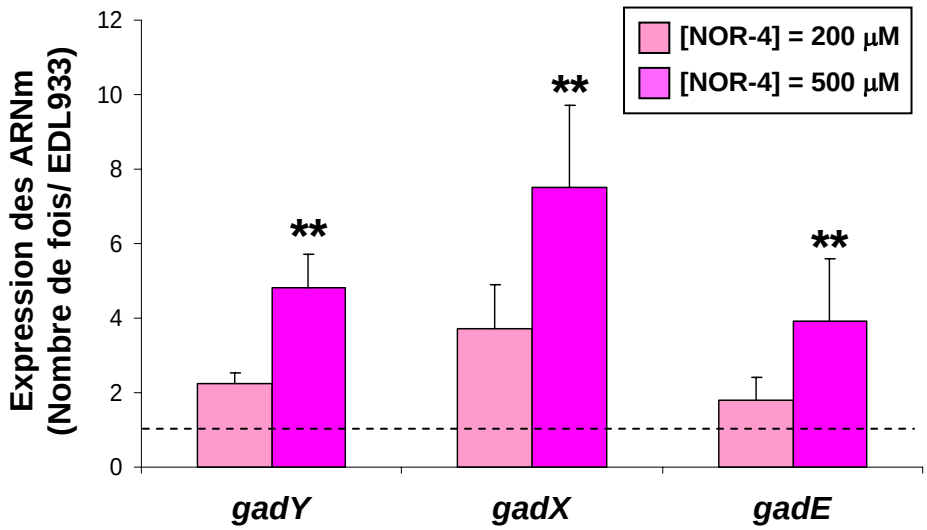
(A) La souche EDL933 a été incubée pendant 6 h en présence ou absence de NOR-4 200 et 500 µM. L'expression des gènes *ler*, *espA*, *espB* et *eae* a été analysée par PCR semi-quantitative en utilisant la technologie Lux. Le niveau d'expression de la souche EDL933 sans traitement est de 1 (ligne pointillée). $P<0{,}01$ *vs*. EDL933; n = 5. (B) Les protéines EspA et EspB sécrétées dans les surnageants de culture ont été détectées par Western-blot. EspA = 20 kDa, EspB = 37 kDa. La figure est une donnée représentative de 3 expériences indépendantes.

Figure 4: NO inhibe l'expression du LEE4 chez les EPEC



La souche EPEC E2348/69 a été incubée pendant 6 h en présence ou absence de NOR-4 200 et 500 µM. L'expression des gènes *espA* et *espB* a été analysée par PCR semi-quantitative; Le niveau d'expression de la souche EDL933 sans traitement est de 1 (ligne pointillée). *P*<0,01 *vs*. EDL933; n = 3.

Figure 5: NO induit l'expression des gènes de régulation du système Gad



La souche EDL933 a été incubée pendant 3 h en présence ou absence de NOR-4 (200 ou 500 µM). L'expression des gènes *gadY, gadX* et *gadE* a été analysée par PCR en temps réel multiplex. Le niveau d'expression de la souche EDL933 sans traitement est de 1 (ligne pointillée). *P*<0,01 *vs*. EDL933; n = 3-6.

de NO (Fig. 3A). En revanche, une concentration de 200 µM de NOR-4 n'a pas eu d'effet sur la transcription de *ler* (Fig. 3A).

De façon concomitante, la quantité de protéines EspA et EspB sécrétées par EDL933 dans le surnageant de culture a été diminuée par le traitement par NOR-4 (Fig. 3B).

Des résultats similaires ont été obtenus avec la souche EPEC E2348/69 (Fig. 4). L'expression relative des gènes *espA* et *espB* en présence de 200 µM de NOR-4 a été respectivement inhibée d'environ 70 et 60% par rapport à la souche EPEC E2348/69 non traitée.

III. NO INDUIT LE SYSTÈME GAD

Nous avons analysé par PCR en temps réel l'expression des gènes *gadY, gadX* et *gadE* dans la souche EDL933 traitée ou non par le NO. En présence de 200 µM de NO, l'expression des gènes *gadY, gadX* et *gadE* a été augmentée de façon dépendante de la concentration en NO en comparaison de la souche EDL933 (Fig. 5).

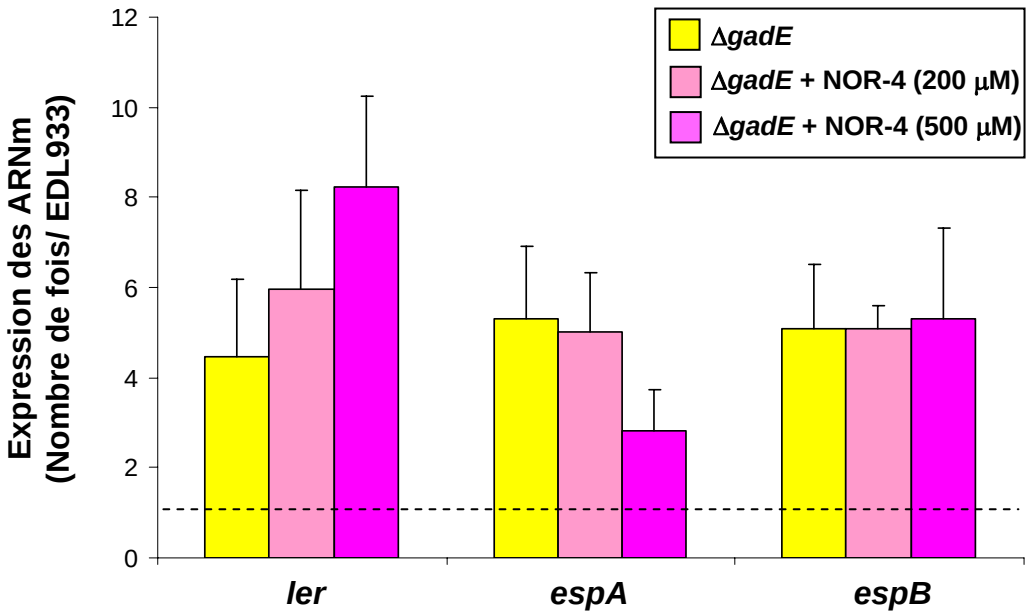
IV. RÉGULATION PAR GadE DE L'EXPRESSION DES GÈNES *esp* ET *ler*

Pour démontrer l'implication de GadE dans l'inhibition de l'expression des gènes du LEE, nous avons construit un mutant *gadE* dans la souche EDL933. L'expression des gènes *espA*, *espB* et *ler* a été analysée par PCR en temps réel dans la souche sauvage et dans le mutant Δ*gadE* en présence ou absence de NOR-4 (200 et 500 µM).

L'expression des gènes *espA*, *espB* et *ler* a été respectivement surexprimée d'environ 4,5, 5,3 et 5,1 fois dans le mutant Δ*gadE* par rapport à la souche sauvage (Fig. 6), suggérant que GadE est un régulateur négatif du LEE. Néanmoins, aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence par l'analyse de variance. Lorsqu'un test *t* de Student a été utilisé pour comparer l'expression des gènes entre la souche sauvage et le mutant, les valeurs suivantes ont été trouvées : $P = 0{,}038$ pour *ler* ; $P = 0{,}043$ pour *espA* ; et $P = 0{,}045$ pour *espB* (n = 3).

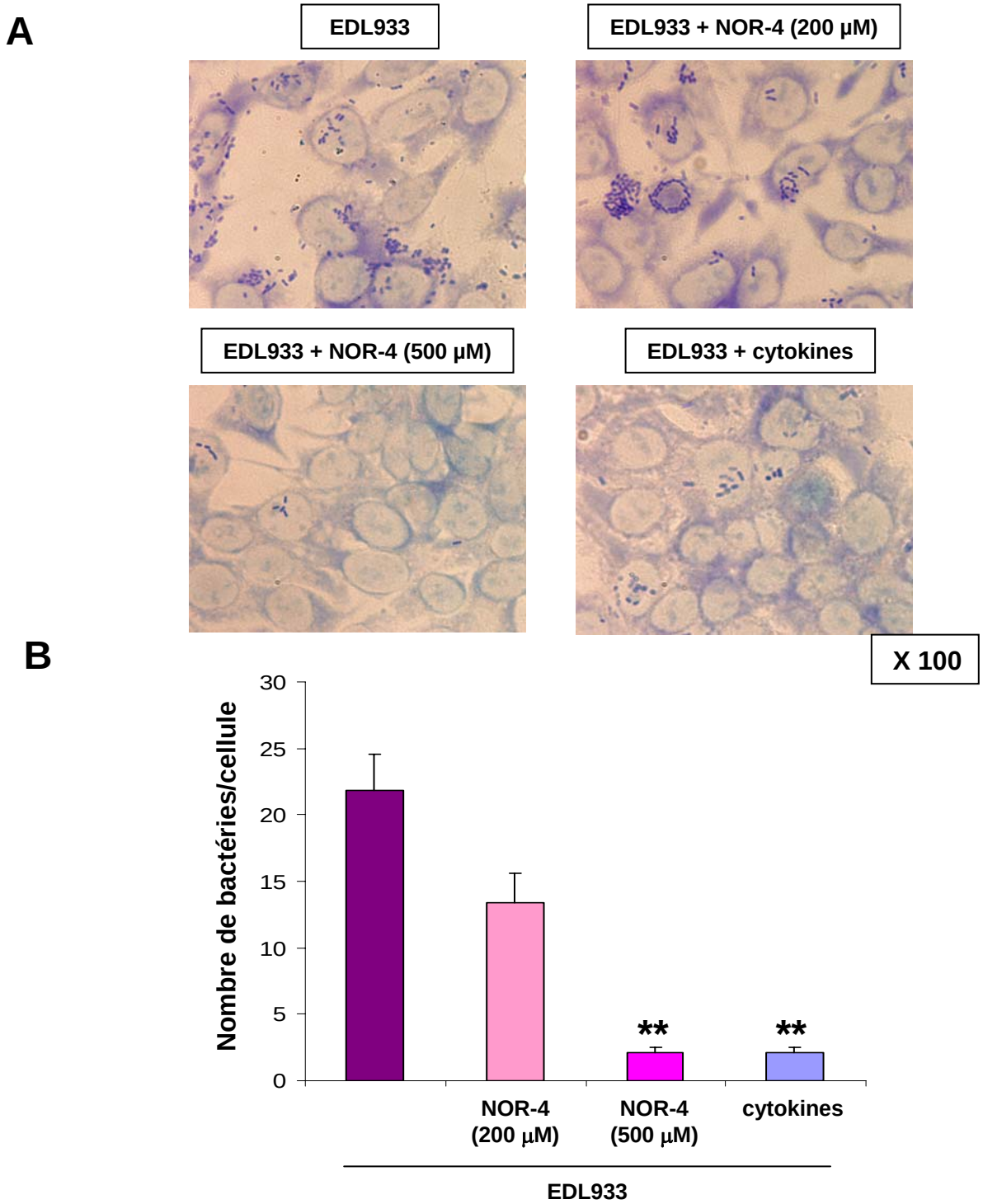
L'ajout de NO au mutant *gadE* n'a pas induit de modification transcriptionnelle des gènes *espA*, *espB* et *ler* par rapport à la souche EDL933 Δ*gadE* non traitée (Fig. 6) ; ce résultat nous amène à penser que NO inhibe le LEE via GadE.

Figure 6: Régulation de *ler*, *espA* et *espB* par GadE



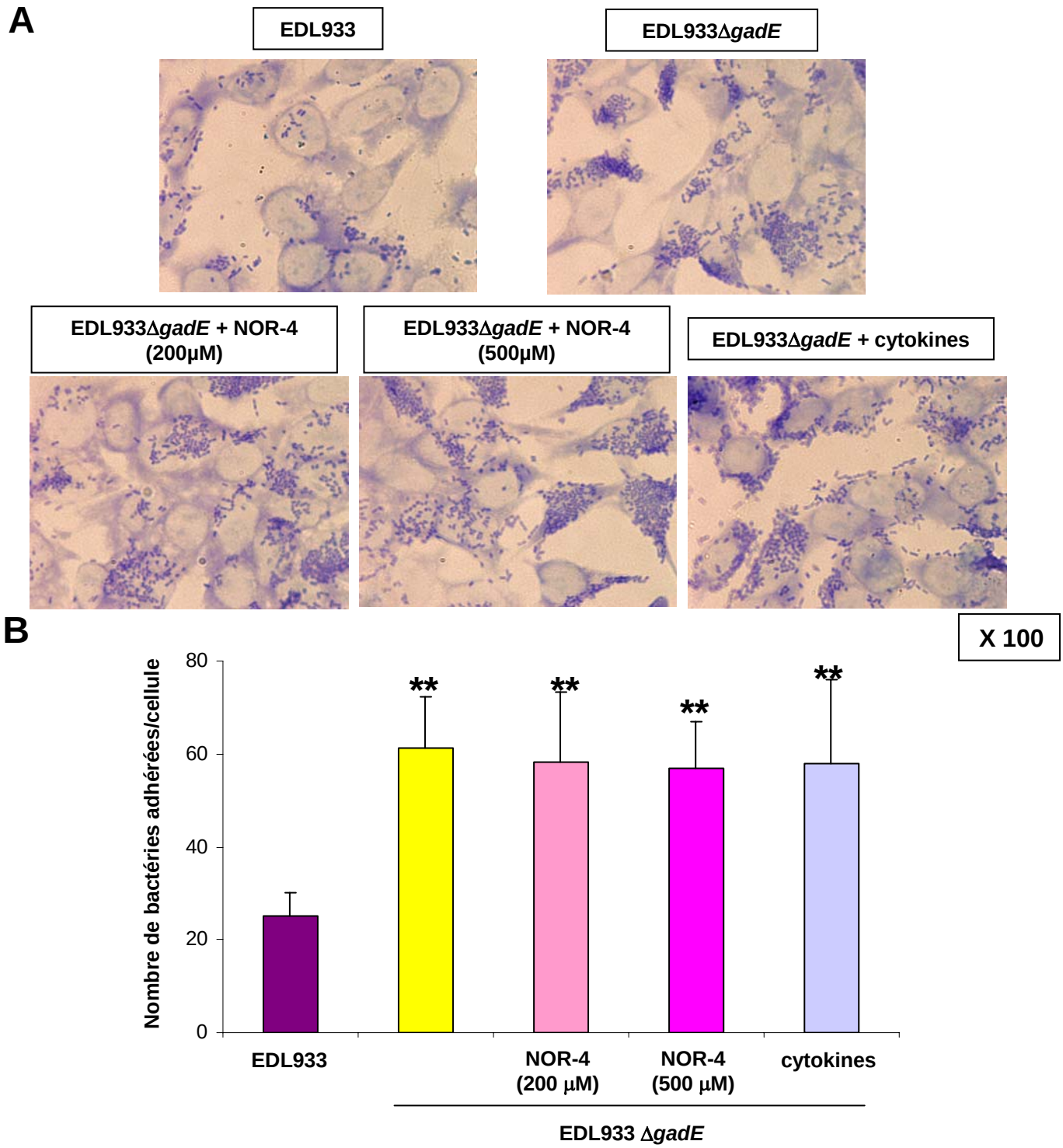
Les souches EDL933 et EDL933 Δ*gadE* ont été incubées pendant 6 h en présence ou absence de NOR-4. L'expression des gènes *ler* , *espA* et *espB* a été analysée par PCR en temps réel multiplex. Le niveau d'expression de la souche EDL933 sans traitement est de 1 (ligne pointillée); n = 3.

Figure 7: Effet du NO sur l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales



Les cellules Hct-8, stimulées ou non par les cytokines, ont été infectées avec la souche EDL933 pendant 6 h en présence ou absence de NOR-4 200 et 500 µM. L'adhésion de la souche EDL933 a été observée par microscopie après coloration au Giemsa (A) et le nombre de bactéries adhérées par cellule à été compté sur 15 champs (B). $P<0{,}01$ *vs*. EDL933; n = 4.

Figure 8: GadE régule l'adhérence des EHEC sur les cellules épithéliales intestinales



Les cellules Hct-8, stimulées ou non par les cytokines, ont été infectées avec la souche EDL933 et le mutant EDL933 Δ*gadE* pendant 6 h en présence ou absence de NOR-4. L'adhésion de la souche EDL933 a été observée par microscopie après coloration au Giemsa (A) et le nombre de bactéries adhérées par cellule à été compté sur 15 champs (B). $P<0,01$ *vs*. EDL933; n = 4.

V. EFFET DU NO SUR L'ADHÉRENCE DES EHEC AUX CELLULES ÉPITHÉLIALES

V-1. NO diminue l'adhésion des EHEC aux cellules Hct-8

Les gènes du LEE des EHEC permettent l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales (Tatsuno I et coll., 2003; Naylor SW et coll., 2005). Puisque NO inhibe l'expression de certains gènes du LEE, nous avons recherché l'effet du NO sur l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales. Nous avons utilisé deux stratégies : *i*) tester l'effet du NO exogène en ajoutant du NOR-4 sur des co-cultures cellules/bactéries et *ii*) analyser l'effet du NO produit par des cellules activées.

En présence de NOR-4 (200 et 500 μM), la capacité d'adhésion de la souche EDL933 a été diminuée par rapport à la souche non traitée (Fig. 7A). Le nombre de bactéries adhérées par cellule a été de 22 ± 3 pour la souche EDL933 tandis que seulement 13 ± 2 et 2 ± 0,4 bactéries adhérées par cellules ont été comptées en présence de 200 et 500 μM de NOR-4 (Fig. 7B).

De façon similaire, l'adhésion de EDL933 aux cellules Hct-8 stimulées par les cytokines et donc productrices de NO (~ 10 μM/puits) a été inhibée d'environ 10 fois par rapport à l'adhésion de EDL933 aux cellules non traitées (Fig. 8A et B).

V-2. Effet de la mutation *gadE* sur l'adhésion des EHEC aux cellules Hct-8

Nous avons également analysé l'adhésion de EDL933 Δ*gadE* aux cellules Hct-8 en présence ou absence de NO.

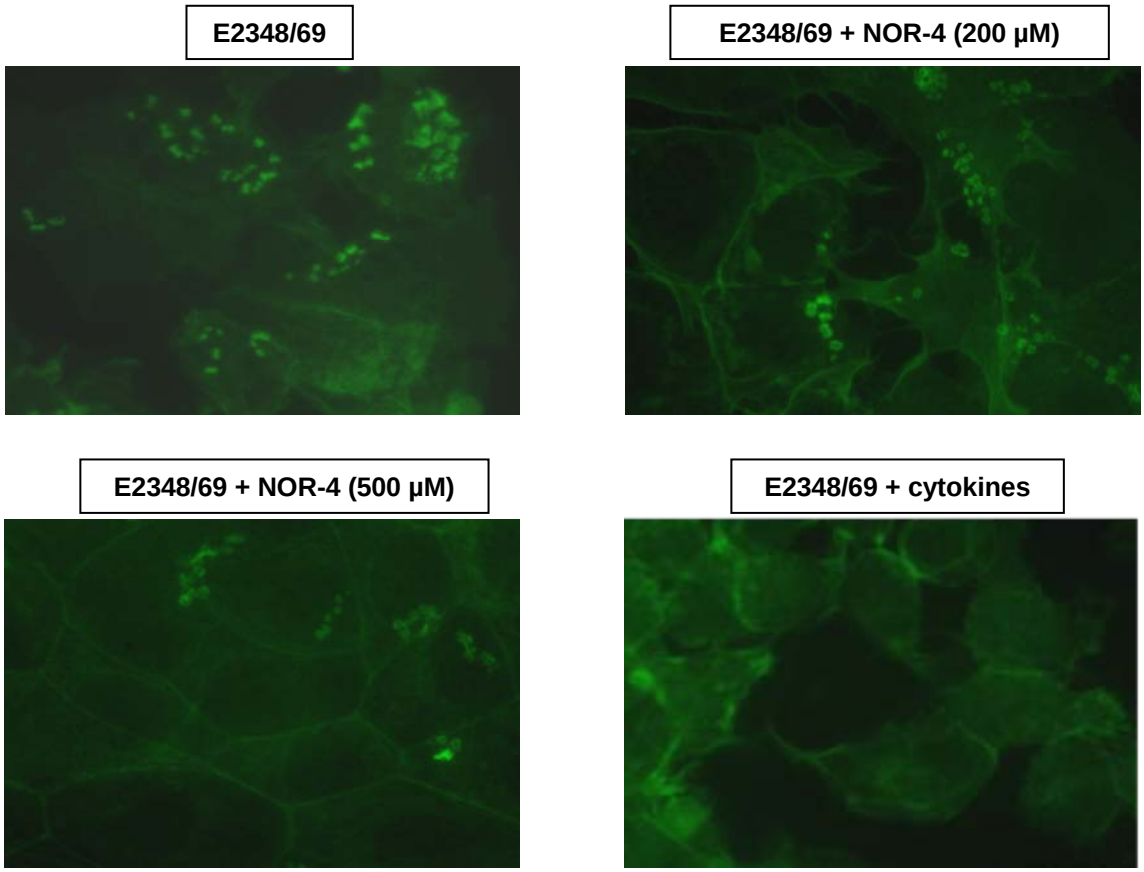
L'adhésion de EDL933 Δ*gadE* a été augmentée d'environ 6 fois par rapport à la souche sauvage (Fig. 8). L'ajout de NO n'a pas modifié l'adhésion de EDL933 Δ*gadE* (Fig. 8).

VI. NO INHIBE LA FORMATION DES LÉSIONS A/E

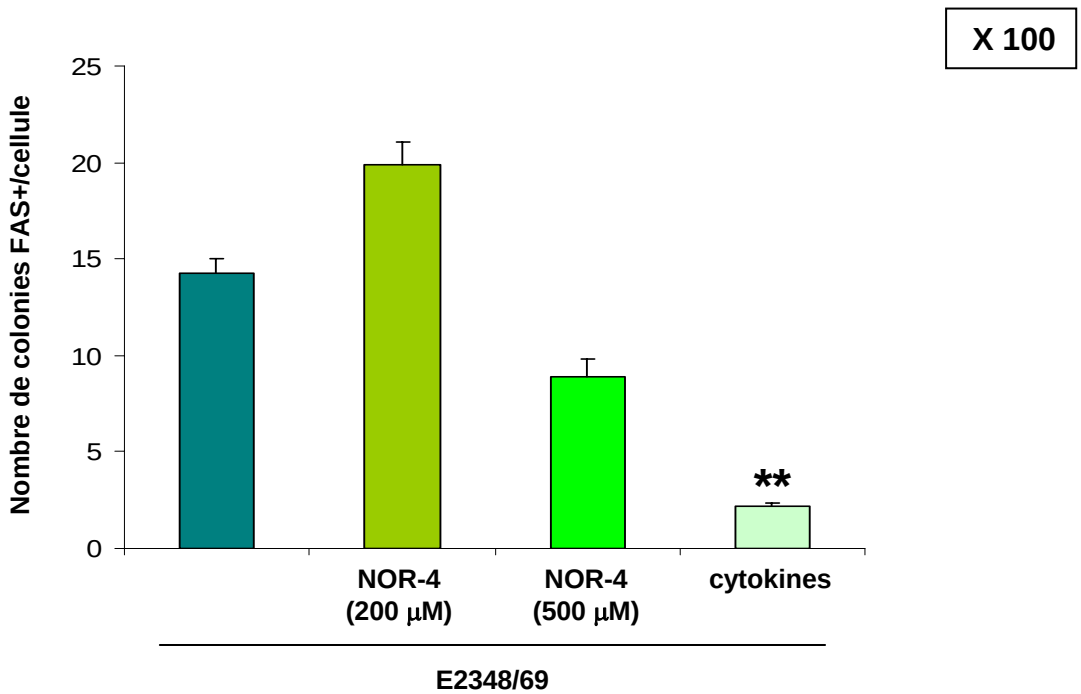
La formation d'un piédestal cellulaire sous les EHEC est difficile à visualiser *in vitro* sur cellules épithéliales ; ces dernières sont observables sur cellules HeLa (Reading NC et coll., 2007). En revanche, les EPEC ont la capacité de former des lésions A/E sur différentes lignées de cellules épithéliales intestinales humaines.

Figure 9: Formation de lésions A/E par les EPEC

A



B



Les cellules Hct-8, stimulées ou non par les cytokines, ont été infectées avec la souche EPEC E2348/69 pendant 6 h en présence ou absence de NOR-4. Les lésions A/E ont été visualisées par microscopie à fluorescence après coloration FAS (A) et le nombre de colonies FAS+ a été dénombré à partir de 50 cellules (B); $P<0{,}01$ *vs*. E2348/69; n = 3.

Ayant décrit précédemment que NO inhibe l'expression de certains gènes du LEE des EPEC, nous avons recherché l'effet du NO produit par des cellules activées sur la formation de piédestaux par ces bactéries par la technique du FAS test.

Le nombre de lésions A/E formées par les EPEC sur les cellules contrôles a été fortement diminué quand les cellules Hct-8 ont été préalablement stimulées par les cytokines (Fig. 9A). Le nombre de micro-colonies produisant un FAS test positif a été réduit d'environ 7 fois (Fig. 9B) lorsque les cellules ont été activées. De même, cette inhibition a été observée lorsque les co-cultures EPEC/Hct-8 ont été traitées par 500 µM de NOR-4 (Fig. 9A et B).

L'adhésion de la souche EPEC E2348/69 sur les cellules Hct-8 a été également diminuée lorsque les cellules ont été traitées avec NOR-4 ou stimulées avec des cytokines par rapport à l'adhésion de la souche EPEC E2348/69 aux cellules non traitées (résultats non montrés).

Nous avons par ailleurs confirmé que les EHEC ne forment pas de colonie FAS *in vitro* sur les cellules Hct-8, Caco-2 et T84 (résultats non montrés).

DISCUSSION

I. MODIFICATIONS TRANSCRIPTIONNELLES DES EHEC INDUITES PAR NO

Dans une première intention, notre objectif a été d'identifier les gènes régulés par NO chez les EHEC en utilisant une approche transcriptomique et la souche de référence EDL933. Les conditions de culture, le donneur de NO et la concentration en NO ont été déterminés à partir de nos travaux précédents décrits dans le chapitre 1.

L'analyse des puces à ADN a montré que 78 gènes ont été surexprimés plus de 1,5 fois de façon significative en présence de NO. Certains de ces gènes, dont *hmpA, hcp-hcr*, *nap* et *nrf*, ont été clairement identifiés par d'autres auteurs comme des facteurs de résistance au stress nitrosant induit par NO (Justino MC et coll., 2005; Filenko N et coll., 2007). Nous avons considéré ces gènes comme des 'témoins positifs' démontrant que les bactéries ont bien été traitées par NO et que l'extraction des ARN, l'hybridation et l'analyse des puces Affymétrix ont été réalisées avec succès. Il est cependant étonnant que l'expression des gènes *ytfE* et *norVW*, régulée respectivement par NsrR et NorR, n'ait pas été induite par NO. L'induction de ces gènes par NO a été mise en évidence par trois analyses transcriptomiques réalisées sur *E. coli* MG1655 en anaérobiose (Mukhopadhyay P et coll., 2004; Justino MC et coll., 2005; Pullan ST et coll., 2007); en revanche, *ytfE* n'a pas été surexprimé chez *E. coli* MG1655 traité par 200 µM de glutathion-*S*-nitrosylé en aérobiose (Flatley J et coll., 2005). Il faut cependant noter que l'induction des gènes *nap* et *nrf* n'a pas été observée par ces auteurs (Mukhopadhyay P et coll., 2004; Justino MC et coll., 2005; Pullan ST et coll., 2007). Selon Pullan et coll., l'expression de *nrfA* a même été inhibée par NO (Pullan ST et coll., 2007). Ces résultats pourraient indiquer que les différentes conditions de culture et d'exposition au NO peuvent conduire à des mécanismes distincts de résistance au NO et/ou que les EHEC et *E. coli* MG1655 ont développé différentes stratégies pour combattre le stress nitrosant.

Les 9 gènes de l'opéron *sdh-suc* ont par ailleurs été surexprimés en réponse au NO. Cet opéron code entre autre pour une succinate déshydrogénase, une protéine mitochondriale à domaine fer-soufre qui possède un hème proche du site de fixation de l'ubiquinone. Compte-tenu de sa structure, cette enzyme pourrait représenter une cible de choix pour NO et il n'est donc pas surprenant d'avoir constaté la surexpression de son gène. Mais l'implication de cette

enzyme dans la résistance au NO n'est qu'hypothétique ; d'ailleurs, aucun site de fixation de NorR ni de NsrR n'a été retrouvé *in silico* dans le promoteur de l'opéron.

Il est par ailleurs important de noter que l'expression des gènes *stx1* et *stx2* n'a pas été modulée de façon significative par NO. Ce résultat est en accord avec nos résultats présentés dans le chapitre 1 démontrant que l'expression de *stx2* n'a pas été inhibée après 6 h d'exposition au NO.

Enfin, nous avons observé l'induction des gènes de régulation du système de résistance à l'acidité Gad. Cependant, le pH n'a pas diminué lors de nos cultures de 6 h, suggérant que les gènes *gadY* et *gadE* ont été induits par un autre mécanisme que l'acidité. GadY est un petit ARN non codant qui favorise l'expression de *gadX* et stabilise son ARNm (Opdyke JA et coll., 2004). Il est donc étonnant de ne pas avoir observé une augmentation significative du nombre de transcrits *gadX* en réponse au NO ; ceci est d'autant plus vrai que le gène *gadW* de l'opéron *gadXW* a été induit par NO. Nous supposons donc que ce résultat est un artéfact. En effet, nous avons par la suite démontré par des expériences complémentaires la surexpression du gène *gadX* en réponse au NO.

Parmi les 111 gènes dont l'expression est inhibée par NO, peu de gènes sont impliqués dans le métabolisme énergétique. De plus, aucun gène de la réponse SOS n'a été induit par NO, confirmant nos résultats du chapitre 1. Nous avons même observé l'inhibition de 9 gènes impliqués dans la réponse au stress et de 4 'heat shock protein'.

Les opérons les plus complets dont l'expression est régulée par NO sont ceux codant pour des protéines impliquées dans la biosynthèse des purines, le métabolisme des polyamines et des entérochélines. Néanmoins, d'autres analyses transcriptomiques réalisées dans notre laboratoire sur les EHEC ont démontré que ces voies métaboliques sont inhibées dans d'autres conditions (différents milieux, contact avec des cellules, …). La modulation de l'expression des gènes codant pour ces facteurs ne serait donc pas spécifique de l'effet du NO.

De façon très intéressante, l'expression de l'opéron LEE4 a été inhibée par NO ; seul le gène *espF* n'a pas été sous-exprimé de façon significative. Les gènes du LEE4 codent principalement pour les protéines impliquées dans le SSTT et plus particulièrement dans la formation du translocon qui permet d'injecter des effecteurs dans la cellule hôte. Cette observation nous a conduit à rechercher l'effet du NO sur l'expression de tous les gènes du LEE. Les résultats des puces Affymétrix ont ainsi révélé que les gènes du LEE5 présentent également une tendance à l'inhibition en réponse au NO.

II. RÉPRESSION DE L'EXPRESSION DU LEE PAR NO

Le pouvoir pathogène des EHEC est caractérisé par leur capacité à adhérer aux cellules épithéliales intestinales et à produire Stx. En adhérant aux cellules épithéliales, les EHEC induisent une perturbation de la signalisation de la cellule hôte et un réarrangement du cytosquelette conduisant à la formation d'un piédestal sous la bactérie et à un effacement des microvillosités épithéliales intestinales. Les gènes nécessaires à l'adhésion intime et à la formation des lésions sont portés par le LEE (Nataro JP and Kaper JB, 1998). Ces étapes sont par ailleurs cruciales pour la colonisation intestinale (Deng W et coll., 2003).

L'expression du LEE est régulée par de nombreux facteurs bactériens spécifiques des EHEC/EPEC, tels que Ler ou GrlR/GrlA, ou présents chez l'ensemble des *E. coli*, dont GadE QseA ou HNS (Fig. 18 de la Revue de Littérature). La transcription et/ou l'activité de ces régulateurs peuvent être modulées par des facteurs environnementaux. Ainsi, l'expression des gènes du LEE et par extension l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales dépend du milieu biologique dans lequel les bactéries se trouvent. À titre d'exemple, les bactéries expriment *gadE* en milieu acide ; puisque GadE réprime le LEE, ce mécanisme permettrait aux bactéries de ne pas adhérer aux cellules dans l'estomac (Shin S et coll., 2001). Il n'est donc pas surprenant qu'un stress nitrosant puisse moduler l'expression de certains gènes du LEE. À ce titre, McCollister et coll. ont démontré que NO inhibe l'expression de l'îlot de pathogénicité SPI2 de *S. enterica* Typhimurium qui code entre autre pour un SSTT (McCollister BD et coll., 2005).

Pour expliquer l'inhibition de l'expression du LEE des EHEC par NO, nous avons émis deux hypothèses : *i*) un régulateur négatif du LEE serait induit par NO ou *ii*) un régulateur positif du LEE serait inhibé par NO. Parmi les régulateurs du LEE spécifiques des EHEC ou présents chez tous les *E. coli* connus, seul le gène codant pour le répresseur GadE a été induit de façon significative en présence de NO. En nous basant sur les travaux de Tatsuno et coll., qui ont démontré que GadE inhibe l'expression des gènes *espA, espB* (LEE4), *escC* (LEE2) et *tir* (LEE5) indépendamment du régulateur Ler dans la souche O157:H7 Sakaï (Tatsuno I et coll., 2003), nous avons analysé l'effet du NO sur la répression du LEE *via* GadE.

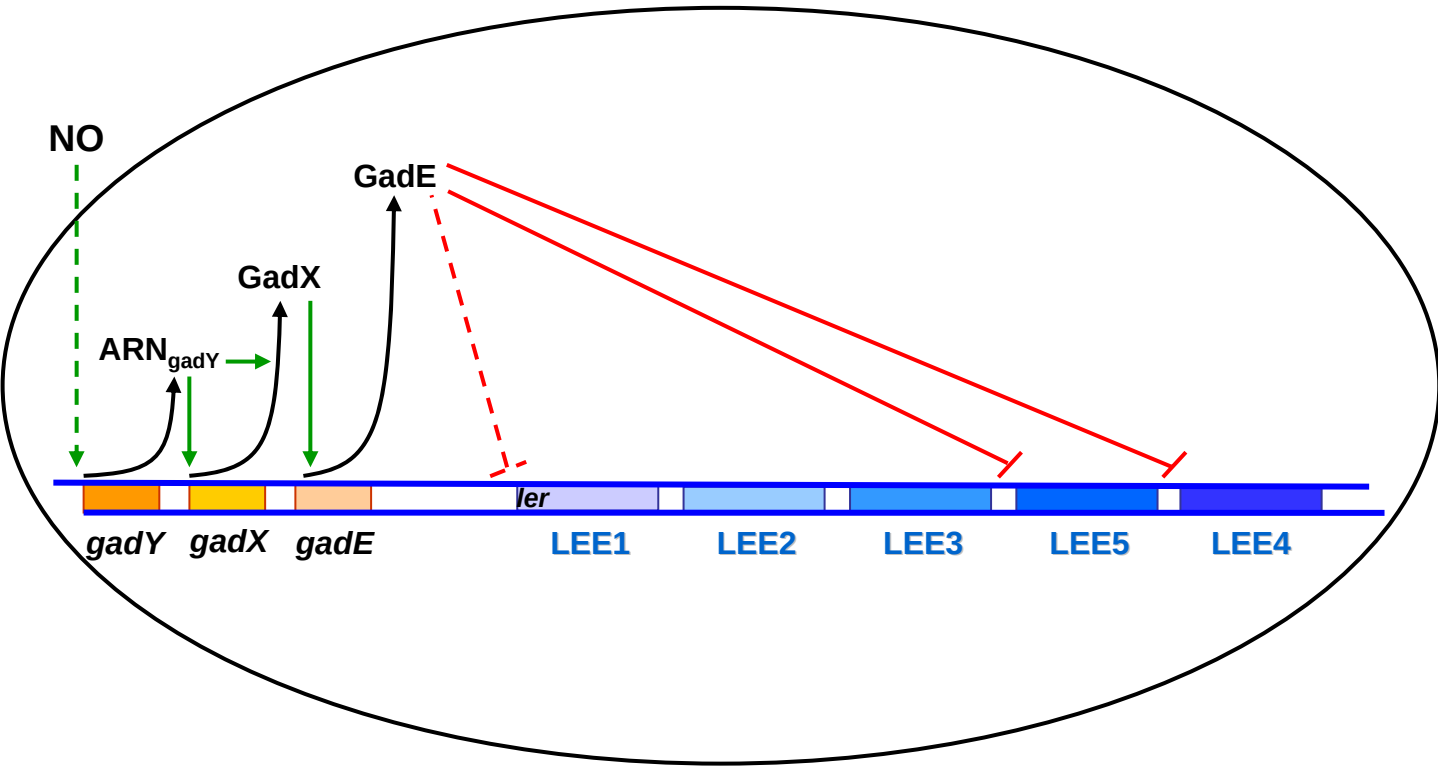
Dans un premier temps, nous avons vérifié les résultats obtenus par puces Affymétrix par des analyses en PCR en temps réel. Nous avons confirmé que 200 μM de NO inhibent l'expression des gènes du LEE4. Nous avons également démontré que NO régule négativement et de façon significative l'expression du gène *eae* du LEE5. Enfin, une

inhibition significative de l'expression de *ler* (LEE1), un activateur transcriptionnel des opérons LEE1, LEE2, LEE3, LEE5 (Mellies JL et coll., 2007) et LEE4 (Sharma VK and Zuerner RL, 2004), a été observé lorsque la souche EDL933 a été traitée par 500 µM de NO, mais pas avec 200 µM. Ces données nous permettent de proposer que NO peut inhiber l'expression des gènes du LEE4 et du LEE5 indépendamment de Ler lorsque les bactéries sont traitées par 200 µM de NO. Néanmoins, nous ne rejetons pas l'hypothèse d'une régulation négative du LEE via une inhibition de Ler induite par des concentrations supérieures de NO. Nous avons également confirmé que NO est capable d'induire les gènes *gadY, gadX* et *gadE*. L'ARN non codant *gadY*, qui induit l'expression du gène *gadX* et stabilise ses ARNm, serait le facteur clé induit par NO.

En se basant sur les travaux de Tatsuno et coll., nous avons analysé l'effet d'une mutation Δ*gadE* sur l'expression des gènes du LEE en présence ou absence de NO. Nous avons montré qu'un mutant délété du gène *gadE* exprime plus les gènes *ler, espA* et *espB* que la souche parentale correspondante. De plus, cette induction n'est pas modulée par l'ajout de NO (200 et 500 µM). Nous concluons donc que NO inhibe l'expression du LEE via l'induction de l'expression de *gadE*. On peut noter que ces résultats sont différents de ceux obtenus par Tatsuno et coll. qui montrent que l'expression de *ler* n'est pas modifiée dans la souche Sakaï Δ*gadE* par rapport à la souche sauvage. Plusieurs différences méthodologiques peuvent expliquer ce résultat. Plus particulièrement, l'analyse des ARNm *ler* a été réalisée après 2 h de culture alors que dans nos conditions, nous avons étudié l'expression du gène *ler* 3 h après le début de culture ; il se peut que l'expression de *ler* ne soit pas différente dans le mutant *gadE* par rapport à la souche sauvage si on se place dans des conditions ou *ler* n'est pas ou peu exprimé dans la souche parentale. De plus, l'expression du gène *ler* a été analysée par Northern-blot alors que dans nos conditions, l'expression de *ler* a été analysée par PCR semi-quantitative, qui est une technique beaucoup plus sensible.

Afin de vérifier si l'inhibition de l'expression du LEE4 et du LEE5 par NO est spécifique des EHEC, nous avons recherché l'effet de NOR-4 sur les EPEC. Nous avons ainsi montré qu'en présence de NO, l'expression des gènes *espA, espB, eae* et *ler* est diminuée dans la souche EPEC E2348/69 par rapport à la souche non traitée à pH 7. Il est intéressant de noter que Shin et coll. ont montré qu'en surexprimant le gène *gadX*, la synthèse des protéines du LEE5 est diminuée à pH 7 par rapport à la souche sauvage (Shin S et coll., 2001). De plus, la mutation de *gadX* provoque l'inhibition de l'expression du gène *perA*, qui code pour un

Figure 10: Modèle d'inhibition du LEE par NO



NO induit l'expression du gène *gadY*. Les ARN non codants de *gadY* induisent la transcription et stabilisent les ARNm de *gadX*. GadX induit la transcription de GadE, un répresseur du LEE4 et du LEE5 des EHEC/EPEC.

Les lignes pointillées indiquent que le mécanisme n'a pas été démontré.

activateur du gène *ler* (Mellies JL et coll., 1999), par rapport à la souche sauvage à pH 8 (Shin S et coll., 2001). GadX semble donc impliqué dans l'inhibition de l'expression du LEE5 chez les EPEC *via* Per. Cependant, les travaux de Shin et coll. ont été publiés avant la découverte de GadE et on peut supposer que certaines observations réalisées par ces auteurs soient en fait dues à la modulation de l'expression de *gadE* par GadX.

Le LEE et particulièrement le LEE4 est impliqué dans l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales et dans la formation des lésions A/E. Ainsi, la capacité d'adhésion à l'épithélium intestinal et de formation des lésions A/E est fortement diminuée dans un mutant Δ*LEE4* par rapport à la souche sauvage chez les EHEC O157:H7 (Naylor SW et coll., 2005). Une souche Sakaï Δ*gadE*, dans laquelle le LEE4 et le LEE5 sont surexprimés, adhère plus aux cellules épithéliales que la souche parentale correspondante (Tatsuno I et coll., 2003).

En se basant sur ces travaux, nous avons analysé l'effet du NO, d'une part sur l'adhésion des EHEC/EPEC sur les cellules épithéliales, et d'autre part sur la formation des lésions A/E chez les EPEC. NO a entrainé une diminution de l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales intestinales ; par ailleurs, la capacité d'adhésion des EHEC a été augmentée dans un mutant *gadE* par rapport à la souche sauvage, sans que l'ajout de NO ne modifie la capacité d'adhésion de EDL933 Δ*gadE*. Ces résultats démontrent que NO diminue l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales en modulant l'expression du LEE via *gadE*. De la même manière, l'adhésion des EPEC aux cellules épithéliales a été diminuée.

D'autre part, 500 μM de NO diminue la formation des lésions A/E chez les EPEC ; ceci n'a pas été observé avec 200 μM de NO. Nous avions préalablement démontré que NO inhibe l'expression du gène *ler* à 500 μM mais pas à 200 μM. On peut donc émettre l'hypothèse qu' une répression globale de l'expression du LEE est nécessaire pour inhiber la formation des lésions A/E, et que la répression de l'expression des LEE4/5 obtenue avec NO à une concentration de 200 μM n'est pas suffisante pour inhiber la formation de ces lésions.

Notons enfin que du NO exogène provenant du NOR-4 ou que du NO endogène, produit par les cellules activées exprimant la iNOS, inhibent l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales, suggérant que cette inhibition pourrait avoir lieu *in vivo* dans les tissus infectés.

Pour conclure, nous démontrons dans ce chapitre que NO est capable de diminuer l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales intestinales en inhibant l'expression du LEE4 et du LEE5 via le système de régulation GadY/GadE (Fig. 10). L'augmentation de la production de NO

par la muqueuse colique infectée pourrait donc permettre non seulement d'inhiber la production de Stx, mais également de limiter l'adhésion et donc la colonisation intestinale par les EHEC.

PERSPECTIVES

Nous avons démontré que NO inhibe l'expression des gènes du LEE4/5 et la synthèse des protéines du LEE4 à 200 et 500 µM. Il reste à démontrer par Western-blot que la synthèse des protéines du LEE5 et plus particulièrement la synthèse de Eae est également inhibée par NO. Il serait intéressant de confirmer l'effet du NO à différentes concentrations sur d'autres gènes du LEE.

Nous envisageons également de construire un mutant *ler* pour vérifier l'implication de ce régulateur dans l'inhibition du LEE par NO et des mutants *gadY* et *gadX* pour confirmer la cascade de régulation proposée dans la Fig. 10.

Il est par ailleurs nécessaire de réaliser la complémentation du mutant EDL933 Δ*gadE* et d'analyser l'expression des gènes du LEE dans la souche complémentée obtenue. D'autre part, il serait intéressant de démontrer que GadE se fixe sur les promoteurs du LEE4/5 par des techniques de retard sur gel. Nous prévoyons d'introduire un plasmide codant pour une fusion GadE-polyHis dans une souche Δ*gadE*. Après traitement ou non par NO, les sites de fixation de GadE seront détectés par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).

Nous devrons également déterminer le mécanisme par lequel NO induit l'expression du système Gad et en particulier *gadY*. Nous déterminerons ainsi si les senseurs de NO, NsrR et NorR sont impliqués dans la régulation du sytème Gad/LEE.

Enfin, NO produit par des cellules stimulées par des cytokines pro-inflammatoires inhibe l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales activées. Le L-NIL, inhibiteur de la iNOS, devra être utilisé dans les co-cultures pour confirmer l'implication du NO dans la modulation de la capacité d'adhésion des EHEC.

CHAPITRE 3

LES EHEC INHIBENT LA PRODUCTION DE NO PAR LES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES

INTRODUCTION

Les entérocytes constituent la première ligne de défense contre les bactéries pathogènes intestinales. Les interactions entre ces cellules et les EHEC conduisent à *i*) des modifications structurales de l'épithélium dépendante du LEE comme les lésions A/E et *ii*) un développement d'un programme de défense non spécifique. Des études *in vitro* ont ainsi montré que les EHEC sont capables d'induire la synthèse de chimiokines et de cytokines par les cellules épithéliales humaines (Dahan S et coll., 2002; Gobert AP et coll., 2008). Cependant, il a été démontré que les EHEC peuvent inhiber la réponse immune innée en interférant avec différentes voies de signalisation et facteurs de transcription. À titre d'exemple, les EHEC de sérogroupes O26 et O157 (LEE^+) diminuent l'activation de NF-κB via EspB (Hauf N and Chakraborty T, 2003) ou Stx (Gobert AP et coll., 2007). De même, les EHEC O157:H7 peuvent réguler l'activation de STAT-1 (Jandu N et coll., 2006) ; néanmoins, le facteur microbien responsable de cet effet n'a pas encore été découvert.

En condition pathophysiologique, la iNOS peut être induite par des bactéries (Witthoft T et coll., 1998) ou par des cytokines proinflammatoires (Salzman AL et coll., 1998) et nécessite l'activation de divers facteurs de transcription incluant NF-κB ou STAT-1 (Ganster RW et coll., 2001). Nous avons démontré dans les chapitres précédents que NO produit par des cellules épithéliales activées inhibe l'expression des gènes du LEE et la production de Stx, suggérant ainsi le rôle essentiel de NO dans la modulation de la virulence bactérienne. Cependant, dans le contexte des interactions EHEC/NO, l'effet de ces bactéries sur l'induction de la iNOS n'a jamais étudié.

Nous avons donc recherché l'effet des EHEC sur la production de NO par les cellules épithéliales du côlon humain.

Tableau 1: Liste des bactéries

Souches	Origine	Sérotype	LEE	Phénotype	*stx1*	*stx2*	Source
EDL933	CH/E	O157:H7	+		+	+	ATCC # 700927
Sakaï	SHU/E	O157:H7	+		+	+	STEC Center
8624	CH/E	O157:H7	+		-	+	STEC Center
CL3	HUS	O113:H21	-		-	+	STEC Center
CL15	HUS	O113:H21	-		-	+	STEC Center
87307	HUS	O113:H21	-		-	+	STEC Center
EDL933 Δ*eae*	NA	O157:H7	+	pas de production d'intimine	+	+	Gobert et coll, 2008
EDL933 Δ*espA*	NA	O157:H7	+	SSTT non fonctionnel	+	+	Beltrametti et coll, 1999
EDL933 Δ*espD*	NA	O157:H7	+	SSTT non fonctionnel	+	+	Kresse et coll, 1999
EDL933 Δ*sepL*	NA	O157:H7	+	SSTT non fonctionnel	+	+	Kresse et coll, 2000
EDL933 Δ*stx1/2*	NA	O157:H7	+	pas de production de Stx1/2	-	-	Gobert et coll, 2007
EDL933 Δ*fliC*	NA	O157:H8	+	non mobile	+	+	Gobert et coll, 2008
DH5α	ND	ND	-		-	-	Stratagène
EcG1	S	ND	-		-	-	ce travail
EcG2	S	ND	-		-	-	ce travail

CH, colites hémorragiques; E, épidémie; NA, non applicable; ND, non déterminé; S, selles humaines.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. LES EHEC

I-1. Souches et conditions de culture

Les souches utilisées dans ce chapitre ainsi que leurs caractéristiques génotypiques sont listées dans le Tableau 1. Douze souches d'EHEC (6 souches de sérotype O157:H7 LEE^+ et six souches de sérotype O113:H21 LEE^-) ont été utilisées. Toutes ces souches ont été isolées de patients atteints de CH ou de SHU. Elles ont été obtenues auprès du National Food Safety and Toxicology Center, Michigan State University, MI, USA. La souche d'*E. coli* non pathogène de laboratoire DH5α a également été utilisée (Tableau 1).

Les bactéries provenant d'un stock en glycérol 20% conservé à -20°C ont été cultivées pendant 1 nuit à 37°C sous agitation dans un milieu DMEM-Glutamax-High Glucose enrichi de 10% de SVF décomplémenté et 10% d'HEPES. À partir de cette pré-culture, une nouvelle culture a été incubée dans le même milieu à 37°C afin d'atteindre une DO_{600nm} de 0,3. En fonction de la MOI désirée, le volume de culture bactérienne a été déterminé et ajouté aux cellules.

I-2. Obtention des souches d'*E. coli* commensaux

Les *E. coli* commensaux EcG1 et EcG2 ont été obtenus à partir de selles d'un sujet sain n'ayant pas eu de traitement médicamenteux depuis plus d'un mois. Les fèces ont été diluées 10^4 fois et mises en culture pendant 24 h à 37°C sur un milieu MacConkey lactose solide. Les colonies roses isolées (métabolisant le lactose) ont été observées au microscope photonique après coloration de Gram pour analyser la morphologie bactérienne et la pureté des cultures. Les caractères biochimiques des souches sélectionnées ont été déterminés grâce à une galerie API20E. Les caractères phylogéniques ont été déterminés par le séquençage de l'ARNr 16s (Robert C et coll., 2007).Nous avons vérifié par PCR que les souches EcG1 et EcG2 ne possèdent pas les gènes *stx2*, *eae* et *espA* (résultats non montrés).

I-3. Construction de mutants

Les mutants isogéniques Δ*espA* (Beltrametti F et coll., 1999), Δ*espD* (Kresse AU et coll., 1999) et Δ*sepL* (Kresse AU et coll., 2000) ont été fournis par Guzman C.A. (Department of Vaccinology, Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Allemagne). La

souche EDL933 Δ*eae* (Gobert AP et coll., 2008) et le double mutant Δ*stx1/stx2* (Gobert AP et coll., 2007) ont été créés dans notre laboratoire par la méthode de Datsenko et Wanner.

Le mutant Δ*chuS* a été obtenu par cette même méthode décrite dans le Chapitre 1. Après amplification de la cassette kanamycine dans la souche CH158 à l'aide d'amorces spécifiques (MtchuS ; Tableau 2), le produit d'amplification a été purifié puis incorporé dans la souche EDL933 pKobeg par éléctroporation. Les bactéries obtenues ont été criblées sur boîte LB + kanamycine et les plasmides thermo-sensibles ont été éliminés par culture à 42°C pendant 1 nuit. Les souches mutantes obtenues ont été vérifiées par PCR et séquençage.

II. ANALYSES BIOCHIMIQUES DES FACTEURS BACTÉRIENS

II-1. Séparation des protéines par chromatographie d'exclusion

La souche EDL933 a été mise en culture pendant 6 h. Après une centrifugation à 12000 g pendant 10 min, le surnageant a été récupéré et filtré. Afin de séparer les protéines, 200 µl de surnageant ont été injectés sur une colonne Superdex 75 (GE Healthcare), préalablement équilibrée dans un tampon TEMA + 0,15 M NaCl pH 7,5. Les protéines ont été éluées à un débit de 0,5 ml/min et des fractions de 1 ml ont été collectées.

II-2. Coloration au nitrate d'argent

Les échantillons ont été séparés sur gel de polyacrylamide 12%-SDS. Le gel a ensuite été fixé pendant 30 min et placé pendant 15 min dans une solution de sensibilisation. Après lavage, le gel a été coloré par une solution au nitrate d'argent et placé dans une solution de révélation jusqu'à obtention de l'intensité désirée. La révélation a été arrêtée en plaçant le gel dans une solution d'arrêt pendant 10 min.

II-3. Coloration des sucres

Cette coloration a été réalisée d'après Fairbanks et coll. (Fairbanks G et coll., 1971). Les échantillons ont été séparés par un gel SDS-PAGE 12%. Le gel a ensuite été incubé pendant 2 h dans l'isopropanol 25% puis incubé 1 h dans du périodate de sodium 0,5%. Le gel a ensuite été placé 1 h dans l'arsenite de sodium 0,5% et acide acétique 5%, puis 1 h dans l'arsenite de sodium 0,1% et acide acétique 5%. Le gel a été rincé dans l'acide acétique 5% pendant 20 min. Enfin, le gel a été placé pendant 1 nuit dans le réactif de Schiff (Sigma) à température ambiante et rincé avec du bisulfite de sodium 0,1% dans HCl 0,01 N. Les sucres apparaissent alors sous forme de bandes roses.

Tableau 2: Lignées cellulaires

Lignée cellulaire	Origine	Morphologie	Gb3	Source
Hct-8	iléum	épithéliale	+	ECACC#90032006
Caco-2	côlon	épithéliale	+	ECACC#86010202
HT-29	côlon	épithéliale	+	ECACC#91012201
T84	côlon	épithéliale	-	ATCC#CCL-248

III. CULTURES DE CELLULES ET INFECTIONS

Quatre lignées de cellules épithéliales intestinales humaines ont été utilisées, Hct-8, Caco-2, HT-29 et T84 (Tableau 3). Ces lignées ont été obtenues auprès de l'European Collection of Cell Cultures.

Ces lignées cellulaires ont été maintenues en culture à 37°C sous atmosphère de 5% de CO_2 dans un milieu DMEM-Glutamax-High Glucose enrichi de 10% de SVF décomplémenté, 10% d'HEPES, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Un complément de milieu F12 (50%) a été fait pour la lignée T84. Tous les milieux et réactifs nécessaires au maintien des lignées ont été obtenus chez Invitrogen.

Les cellules ont été mises en plaque de 6 puits (10^6 cellules/puits) ou de 24 puits (5×10^5 cellules/puits) et cultivées pendant 5-7 jours jusqu'à confluence ; à ce stade, le nombre de cellules a été respectivement estimé à 3×10^6 cellules/puits et à 10^6 cellules/puits sur plaques de 6 et 24 puits. Les cellules confluentes ont été stimulées avec un cocktail de cytokines composé d'IFN-γ (50 ng/ml), de TNF-α (20 ng/ml) et d'IL-1β (5 ng/ml) (Pierce) et/ou infectées par les bactéries en phase exponentielle de croissance dans un milieu sans antibiotique. Le donneur de monoxyde de carbone (CO) CORM-2 (dimère de tricarbonyldichlororuthénium), la bilirubine, ou un inhibiteur d'hème oxygénase (HO), le ZnPP (zinc protophorphyrin IX ; 10 µM), ont été ajoutés aux cellules ; ces réactifs ont été obtenus chez Sigma.

À la fin de l'incubation, les cellules ont été lavées en PBS et utilisées pour extraire l'ARN, ou ont été remises en culture pendant 18 h dans un milieu frais contenant des antibiotiques pour déterminer la concentration en NO en utilisant le kit Nitrate/Nitrite Assay (Sigma).

IV. ANALYSES DES ARNm

Les ARN ont été extraits par la méthode d'extraction au TRIzol. Le protocole est détaillé dans le Chapitre 1. Les ARN (2 µg) ont été rétro-transcrits en utilisant 30 ng/µl d'amorces OligodT pour amplifier spécifiquement les ARNm eucaryotes possédant une queue de polyA, 0,5 mM de chaque dNTP, 10 mM de DTT et 5 U/µl de SuperScript II Reverse Transcriptase. La réaction s'est déroulée pendant 50 min à 42 °C puis l'enzyme a été inactivée à 70 °C pendant 15 min. Tous les réactifs nécessaires à la transcription inverse ont été obtenus chez Invitrogen.

Tableau 3: Liste des amorces

Amorces	Séquences (5'-3')
MtchuS-F	AATCATCTGCCCCGATATTTCGGGGCATTTATCTGGAAGGAAGAGAGACAAGCCACGTTGTGTCTCAAAATC
MtchuS-R	AATATAAAGAGGCCCAGCAATAAATAGCCAGACCTCCCGTTAATTATACGTTAGAAAAACTCATCGAGCA
h-actine-F	CTCTGGTGGTGAAGCTGTAG
h-actine-R	CCAGAGCAAGAGAGGTATCC
h-inos-F	ACCTCAGCAAGCAGCAGAAT
h-inos-R	ATCTGGAGGGGTAGGCTTGT
h-hmox1-F	GGCAATCTTTTTGAGCACCT
h-hmox1-R	ACATCTATGTGGCCCTGGAG

Tableau 4: Liste des inhibiteurs pharmacologiques

Inhibiteur	Cible moléculaire	Concentration
MG132	NF-kB	20 µM
BAY 11-7082	NF-kB	20 µM
PD98059	MEK	25 µM
SB600125	p38 MAPK	2 µM
Gö 6984	PKC	20 µM
wortmaninn	PI3K	20 nM
Akt inhibiteur	Akt	20 µM
SI	STAT-1	20 µM
JI	JAK-2	20 µM

L'analyse semi-quantitative de l'expression des gènes de la iNOS et *hmox-1*, le gène codant pour HO-1, a été réalisée par PCR en temps réel. Le gène codant pour la β-actine a été utilisé comme gène de ménage de référence (Dydensborg AB et coll., 2006). Les PCR en temps réel ont été effectuées sur les ADNc (2 µl) avec 0,5 µM des amorces h-iNOS, h-hmox-1 ou h-actine (Tableau 2) et le kit SYBR Premix Ex *Taq* kit (Lonza) dans l'appareil Mastercycler ep Realplex Silver apparatus (Eppendorf). Les conditions de PCR pour chaque gène sont données en Annexe VII. Les niveaux d'expression des ARNm des gènes *iNOS* et *hmox-1* ont été normalisés par rapport au contrôle interne *β-actine* et par rapport à une condition basale (cellules non traitées) en utilisant la méthode comparative du seuil de fluorescence. Les résultats sont alors présentés en tant qu'expression relative du gène cible/cellules non traitées.

Certains échantillons ont également été analysés par RT-PCR classique. Pour cela, l'amplification a été réalisée sur 1 µl d'ADNc en présence de 0,12 pmoles de chaque amorce h-iNOS ou h-hmox-1 ou 0,03 pmoles de h-actine (Tableau 2) et 0,25 U de Platinium *Taq*DNA Polymérase (Invitrogen).

V. ÉTUDES DES VOIES DE SIGNALISATION

V-1. Inhibiteurs pharmacologiques

Les inhibiteurs pharmacologiques utilisés dans ce chapitre ont été listés dans le Tableau 4. Nous avons utilisé des inhibiteurs des voies des MAPK, PI3K-Akt, Jak-STAT et PKC. Tous ces inhibiteurs ont été obtenus chez Calbiochem.

Les inhibiteurs ont été ajoutés aux cellules 30 min avant le début de l'infection.

V-2. EMSA

L'EMSA (pour electro-mobility shift assay) est une technique qui permet de détecter la présence de facteurs de transcription activés dans les noyaux en analysant leur fixation sur leur séquence consensus.

Les protéines nucléaires ont été purifiées par le kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extract (Pierce). La concentration en protéines a été déterminée par le kit Protein Assay (Bio-Rad).

Nous avons utilisé deux sondes nucléotidiques double brin contenant les séquences consensus (lettres en italique) des sites de liaison de NF-κB (5'-CAA*GGGGACTTTCC*ATG-

3') et STAT-1 (5'-GACAT*TTCCCGTAA*ATC-3'); ces sondes ont été biotinylées par le kit Biotin 3' End DNA Labeling (Pierce). Les protéines nucléaires (2 μg) ont été incubées avec 1 ng de poly(dI:dC) et 20 fmoles de sondes biotinylées dans un volume final de 20 μl de EMSA-binding buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, and 1 mM DTT) pendant 30 min. Afin de vérifier la spécificité de la réaction, 2 pmoles de sondes non marquées ont été ajoutées au mix réactionnel. Les échantillons ont ensuite été séparés par un gel 5% PAGE et transférés sur une membrane de nylon chargée positivement sous l'action d'un champ électrique. Les sondes oligonucléotidiques ont été fixées à la membrane par les ultra-violets. La présence de la sonde biotinylée a été détectée par réaction avec une sonde streptavidine-peroxydase suivie de chimioluminescence (Chemiluminescent Nucleic Acid detection Module, Pierce).

V-3. Immunolocalisation des facteurs de transcription

Les cellules ont été cultivées en LabTek (Nunc) (10^5 cellules/puits) puis stimulées avec le cocktail de cytokines (IFN-γ + TNF-α + IL-1β) et/ ou infectées avec EDL933 (MOI=10) pendant 3 h. Les cellules ont ensuite été lavées et fixées par 1 ml de méthanol 100% pendant 20 min à -20°C. Après lavage en PBS, une étape de saturation a été réalisée. Pour cela, les cellules ont été incubées avec des Ig de chèvre (1/1000) dans du PBS-1% SVF pendant 45 min. Puis les cellules ont été incubées pendant une nuit avec un Ac primaire de lapin dilué dans du PBS-SVF 1%-saponine 0,1% : Ac anti-NF-κB p65 (1/500 ; Calbiochem) ou Ac anti-STAT-1 (1/100 ; Epitomics). Les cellules ont ensuite été lavées et incubées avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin marqué au DyLight™ 647 (1/1000 ; Pierce) pendant 1 h à 37°C. Les noyaux ont été colorés au DAPI (1/1000) pendant 1 min. Les lames ont alors été séchées et observées au microscope confocal (Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope).

VI. TRANSFECTION

Afin d'inhiber l'activité de HO-1 dans les cellules Hct-8, nous avons utilisé la technique des siRNA (pour small interfering RNA). Pour cela, les cellules ont été cultivées en plaque de 6 puits et transfectées pendant une nuit avec 200 nM de siRNA dirigé contre HO-1 (5'-AAGCCACACAGCACUAUGUAAdTdT-3' et 5'-UACAUAGUGCUGUGUGGCUUdTdT-3' ; Benallaoua M et coll., 2007) ou 200 nM de siRNA dirigé contre la lamine (Dharmacon)

en utilisant le kit siLenFect Lipid (Bio-Rad). Les cellules ont ensuite été lavées et stimulées avec les cytokines et/ou infectées avec EDL933.

VII. WESTERN-BLOT

La synthèse de HO-1 a été analysée par Western-blot. Les échantillons protéiques ont été obtenus à partir de surnageants bactériens après une culture de 6 h puis dosés par la méthode de Bradford. Les échantillons (25 μg) ont été dénaturés par un choc thermique puis déposés sur un gel de polyacrylamide 10%-SDS. Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose sous l'action d'un champ électrique. La membrane a ensuite été saturée par une solution de PBS-lait écrémé 5%-Tween 0,1% et hybridée pendant une nuit à 4°C avec un anticorps polyclonal dirigé contre HO-1 (StressGen). Après 3 lavages en PBS-Tween 0,5%, la membrane est incubée avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase pendant 1 h à température ambiante. Une détection chimioluminescente a été réalisée.

Des protéines de chrondrocytes provenant de souris traitées à la co-protoporphyrine ont été utilisées comme contrôle positif pour les Western-blot (Benallaoua M et coll., 2007).

Ces Western-blot ont été réalisés par François Rannou et Natacha Thélier du laboratoire de Pharmacologie, Toxicologie et Signalisation Moléculaire, Université Paris Descartes, Paris.

VIII. ANALYSES STATISTIQUES

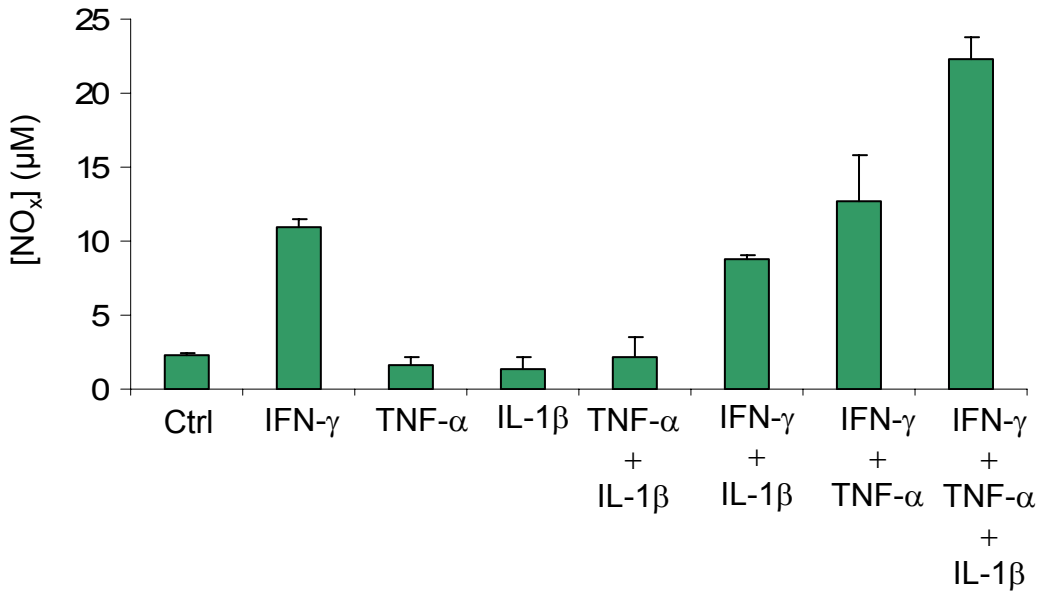
Les données obtenues sont présentées sous forme de moyenne ± erreur standard à la moyenne. L'analyse statistique a été réalisée par un test *t* de Student quand seulement 2 groupes ont été comparés ; les échantillons ont été considérés comme non appariés. Une analyse de variance avec le test de Student-Newman-Keuls unilatéral a été utilisée pour analyser les différences statistiques lorsque plus de 2 groupes ont été comparés.

Tableau 5: Production de NO_x par les différentes lignées cellulaires

		Ctrl	Cytokines	
			6 h	24 h
Hct-8				
	[NOx] (µM)	0,8 ± 0,3	21,2 ± 0,3	152,6 ± 6,3
Caco-2				
	[NOx] (µM)	0,6 ± 0,2	18,4 ± 0,9	123,1 ± 2,4
T84				
	[NOx] (µM)	0,9 ± 0,3	17,3 ± 0,7	136,4 ± 7,8

Les cellules Hct-8 ont été cultivées en plaque de 24 puits (5.10^5 cellules/puits) jusqu'à confluence. Le cocktail de cytokines (IFN-γ, TNF-α, IL-1β) a été ajouté pendant 6 h ou 24 h. Le dosage de NO_x (NO_3^- + NO_2^-) a été effectué par la réaction de Griess à partir des surnageants de culture; n = 3.

Figure 1: Effet des cytokines sur la production de NO par les cellules Hct-8



Les cellules Hct-8 ont été stimulées pendant 6 h avec des cytokines. Le dosage de NO_x a été effectué par la réaction de Griess, après réduction de NO_3^- en NO_2^-, à partir des surnageants de culture; n = 3.

RÉSULTATS

I. PRODUCTION DE NO PAR LES DIFFÉRENTES LIGNÉES DE CELLULES

De nombreuses études démontrent que la combinaison des trois cytokines proinflammatoires, TNF-α, IL-1β et l'IFN-γ est capable d'induire l'expression du gène codant pour la iNOS dans les cellules épithéliales intestinales humaines. Nous avons donc testé l'effet de ces cytokines sur la production de NO par nos lignées de cellules épithéliales humaines.

Pour cela, les cellules ont été stimulées de 6 à 24 h avec les cytokines seules ou en combinaison. La concentration en NO a été mesurée par la réaction de Griess. Après stimulation des cellules par la combinaison des trois cytokines (TNF-α + IL-1β + IFN-γ), les lignées Hct-8, Caco-2 et T84 ont produit des quantités importantes de NO à 6 h et 24 h (Tableau 5). De façon intéressante, on peut noter que ces trois lignées ne produisent que NO_3^-. Par ailleurs, nous avons testé l'effet des cytokines seules ou en différentes combinaisons. Les cytokines TNF-α ou IL-1β utilisées individuellement et la combinaison TNF-α + IL-1β n'ont pas induits la production de NO dans les trois lignées cellulaires (résultats montrés uniquement pour la lignée Hct-8 ; Fig. 1). Une production de NO a été observée après stimulation par l'IFN-γ, IFN-γ+ IL-1β et IFN-γ + TNF-α (Fig. 1). Ces données suggèrent que l'IFN-γ est essentiel pour induire la production de NO par ces lignées de cellules épithéliales.

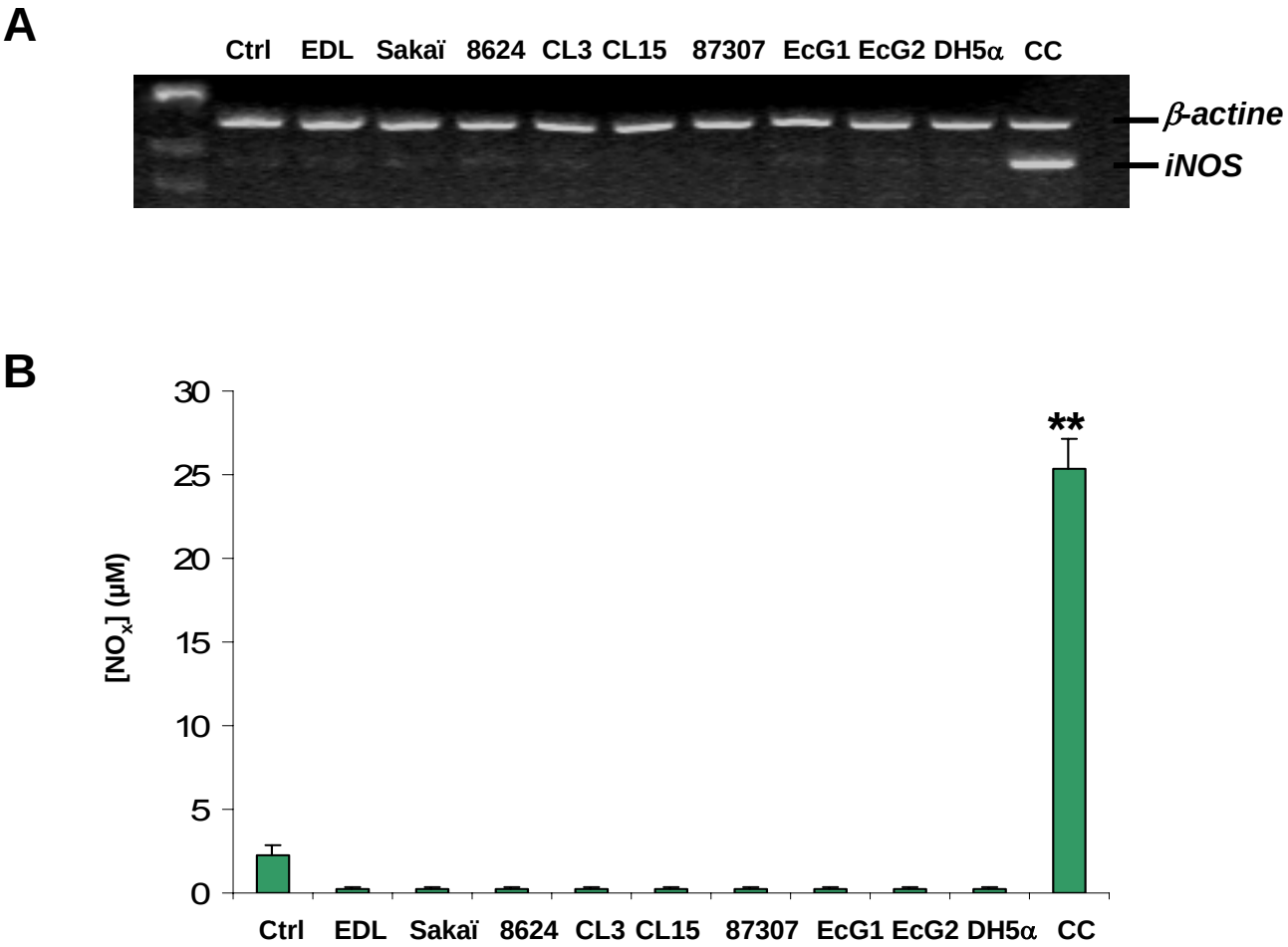
Concernant la lignée HT-29, aucune production de NO n'a été détectée dans les cellules activées par les cytokines ajoutées seules ou en combinaison. Nous avons décidé de ne plus travailler sur cette lignée cellulaire pour la suite de l'étude.

II. EFFET DES EHEC SUR LA PRODUCTION DE NO PAR LES CELLULES EPITHELIALES HUMAINES

Des bactéries entéro-invasives sont capables d'induire l'expression du gène de la iNOS dans les cellules épithéliales intestinales (Witthoft T et coll., 1998). Nous avons analysé l'effet de différentes souches d'EHEC et d'*E. coli* non pathogènes sur l'expression du gène de la iNOS.

Les souches utilisées n'ont pas induit l'expression de ce gène dans les cellules épithéliales Hct-8 (Fig.2A). De façon concomitante, les différentes souches n'ont pas stimulé

Figure 2: Les EHEC n'induisent pas la iNOS dans les cellules épithéliales



Les cellules Hct-8 ont été infectées avec les bactéries pendant 6 h. L'expression des ARNm de la iNOS a été analysée par RT-PCR (A). La concentration en NOx a été mesurée dans les surnageants de cellules 18 h après la fin de l'infection (B). CC; cocktail de cytokines. **, *P*<0,01 en comparaison des cellules non traitées; n = 4.

la production de NO par ces cellules (Fig. 2B). Des résultats identiques ont été obtenus avec les cellules Caco-2 et T84.

En revanche, l'expression de la iNOS et la production de NO ont été stimulées par les cytokines (Fig. 2A et 2B).

III. LES EHEC INHIBENT L'INDUCTION DE LA iNOS DANS LES CELLULES ÉPITHÉLIALES ACTIVÉES

Les EHEC n'induisant pas l'expression de la iNOS dans les cellules épithéliales intestinales humaines, nous avons émis l'hypothèse que ces bactéries pourraient moduler la production de NO dans cellules épithéliales activées par des cytokines.

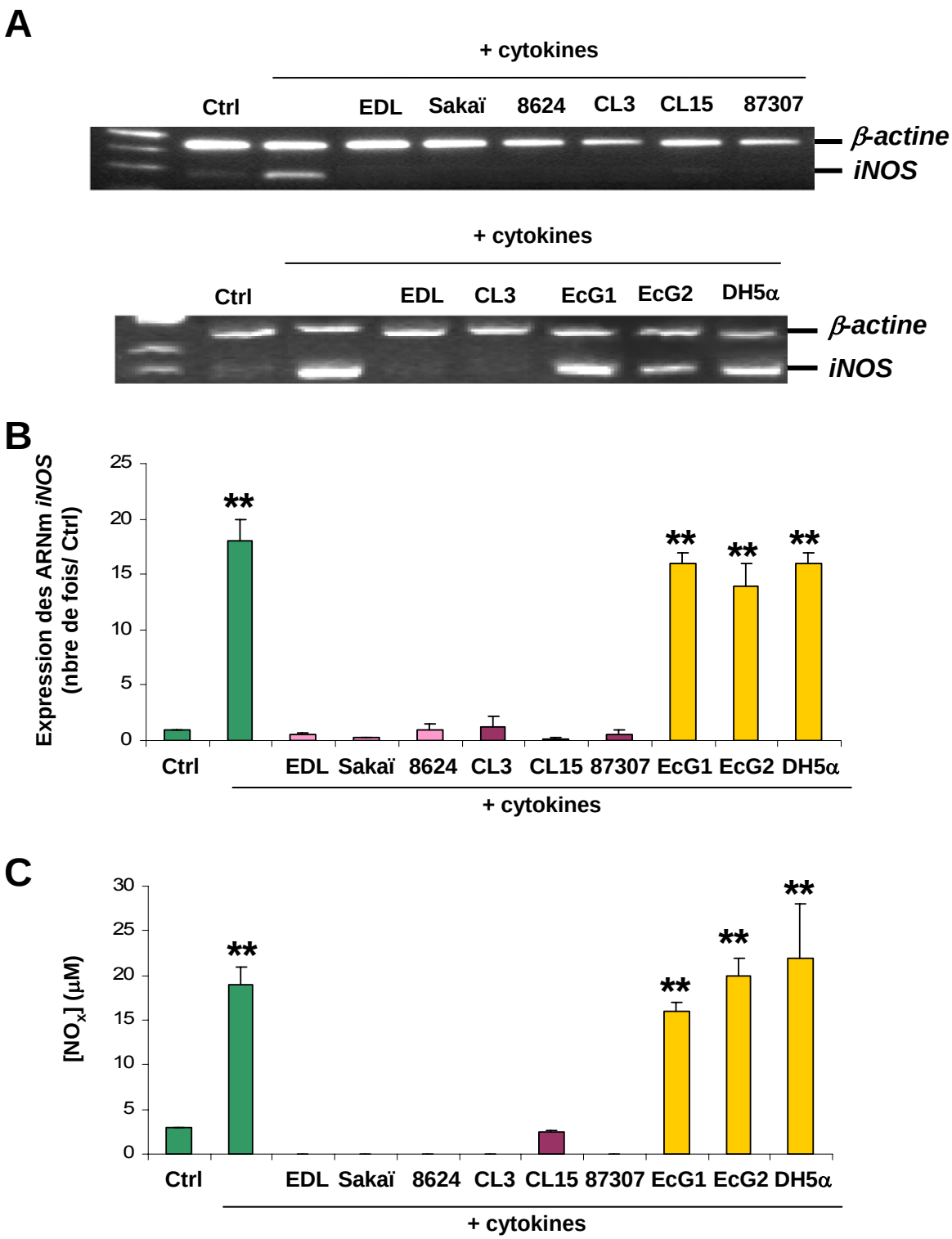
Lorsque les cellules Hct-8 ont été stimulées pendant 6 h avec le cocktail de cytokines (IFN-γ, TNF-α, IL-1β), une augmentation significative de l'expression des ARNm de la iNOS par rapport aux cellules non stimulées a été observée (Fig. 3A et B). En revanche, quand les cellules stimulées par des cytokines ont été infectées simultanément par les EHEC de sérotype O157:H7 ou O113:H21 avec une MOI de 10, l'expression des ARNm de la iNOS a été totalement inhibée en comparaison aux cellules stimulées par les cytokines (Fig. 3A). Ces résultats ont été confirmés par PCR en temps réel (Fig. 3B) : l'expression du gène a été induite d'environ 20 fois quand les cellules ont été stimulées par des cytokines, et cette augmentation a été significativement inhibée de 97 à 100 % quand les EHEC ont été rajoutés aux cellules stimulées. Par ailleurs, cette inhibition n'a pas été retrouvée quand les cellules stimulées ont été infectées avec des *E. coli* commensaux EcG1 ou EcG2 ou avec *E. coli* DH5α (Fig. 3A et B).

De façon similaire, la production de NO a été augmentée quand les cellules ont été stimulées par les cytokines. L'ajout des différentes souches d'EHEC aux cellules stimulées a entrainé l'inhibition totale de la production de NO en comparaison aux cellules activées (Fig. 3C). La production de NO n'a pas été inhibée par des *E. coli* commensaux ou *E. coli* DH5α (Fig. 3C).

Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules Caco-2 et les cellules T84 (Tableau 6) ou lorsque les cellules ont été stimulées avec l'IFN-γ seul (résultats non montrés).

Enfin, l'activité inhibitrice des EHEC sur l'expression de la iNOS n'a pas été observée lorsqu'une MOI de 1 a été utilisée (résultats non montrés). De plus, lorsque les EHEC ont été

Figure 3: Les EHEC inhibent l'expression du gène de la iNOS dans les cellules épithéliales activées



Les cellules Hct-8 ont été stimulées et/ou infectées (MOI = 10) pendant 6 h. L'expression des ARNm de la iNOS a été analysée par RT-PCR (A) et PCR en temps réel (B). La concentration en NOx a été mesurée dans les surnageants de culture 18 h après l'infection (C). **, $P<0{,}01$ *vs*. les cellules contrôles et les cellules stimulées et infectées avec les souches d'EHEC; n = 4.

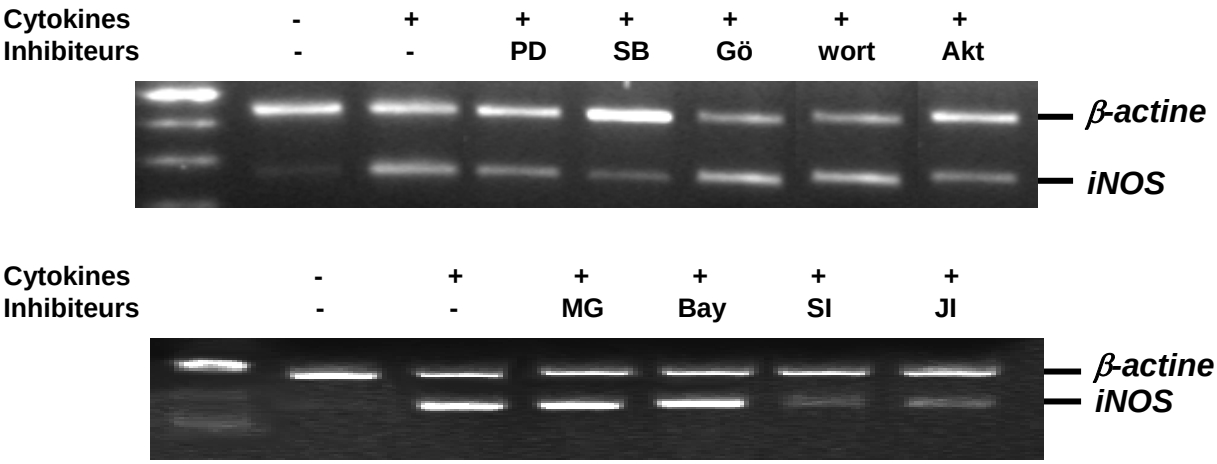
Tableau 6- Induction de la iNOS dans les lignées de cellules épithéliales humaines

		Ctrl	Cytokines	Cytokines + EDL933
Caco-2				
	ARNm iNOS*	1	18.4 ± 0.3	0.5 ± 0.3
	[NOx] (µM)	0.8 ± 0.3	20.2 ± 0.3	1.2 ± 0.3
T84				
	ARNm iNOS*	1	17.3 ± 0.3	0.8 ± 0.3
	[NOx] (µM)	0.6 ± 0.3	21.2 ± 0.3	1.1 ± 0.3

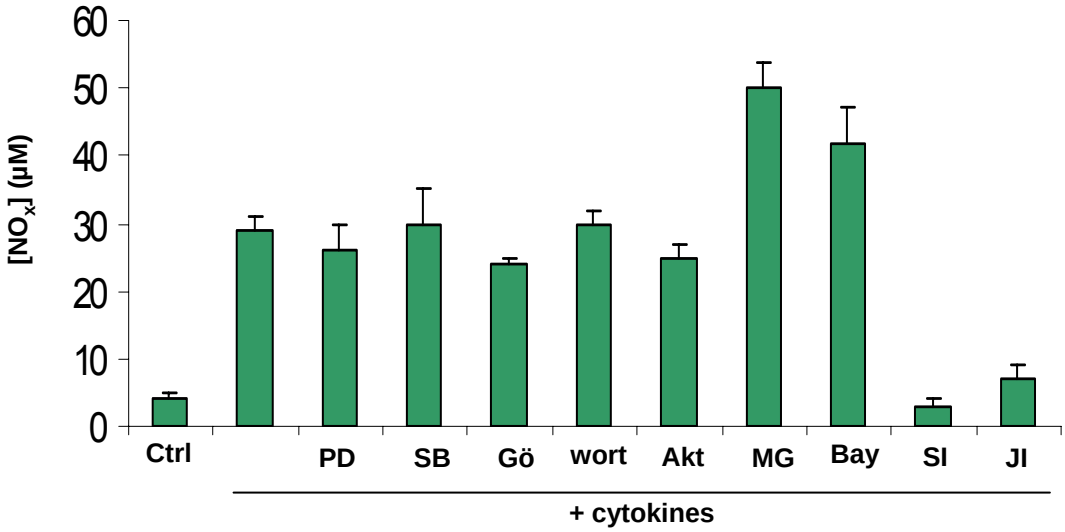
Les cellules Caco-2 ou T84 ont été stimulées par des cytokines, en présence ou absence de EDL933, pendant 6 h. L'expression des ARNm de la iNOS a été analysée par PCR en temps réel (* les valeurs correspondent à l'induction/Ctrl). Le dosage de NO a été effectué 18h après la fin du traitement.; n = 3-4.

Figure 4: Etude des voies de signalisation impliquées dans la transcription du gène de la iNOS

A



B



Les cellules Hct-8 ont été traitées avec les différents inhibiteurs pharmacologiques pendant 30 min puis stimulées par les cytokines pendant 6 h. L'expression des ARNm de la iNOS a été analysée par RT-PCR (A). Après les 6 h de stimulation, les cellules ont été lavées et incubées pendant 18 h dans un milieu contenant des antibiotiques et la concentration en NO a été mesurée (B; n = 3). PD, PD98059; SB, SB202190; Gö, Gö6983; wort; wortmaninn; Akt, inhibiteur de Akt, Bay, Bay 1170-82; MG, MG132.

ajoutés 3 h après le début de la stimulation par les cytokines, nous n'avons pas observé de modulation de la production de NO en comparaison des cellules stimulées.

L'ensemble de ces données démontre que les EHEC O157:H7 et O113:H21 répriment la transcription inductible du gène de la iNOS dans les cellules épithéliales intestinales humaines.

IV. PERTURBATION DE LA SIGNALISATION CELLULAIRE PAR LES EHEC

IV-1. Étude de la signalisation impliquée dans l'induction de la iNOS

Afin de déterminer le mécanisme cellulaire par lequel les EHEC inhibent l'induction de la iNOS, nous avons tout d'abord déterminé les évènements moléculaires induits par les cytokines et conduisant à la transcription du gène de la iNOS. Nous nous sommes focalisés sur les principales voies de signalisation reconnues pour moduler la transcription de ce gène: la voie des MAPK, de la PI3K/Akt, des PKC et Jak-STAT et le facteur de transcription NF-κB.

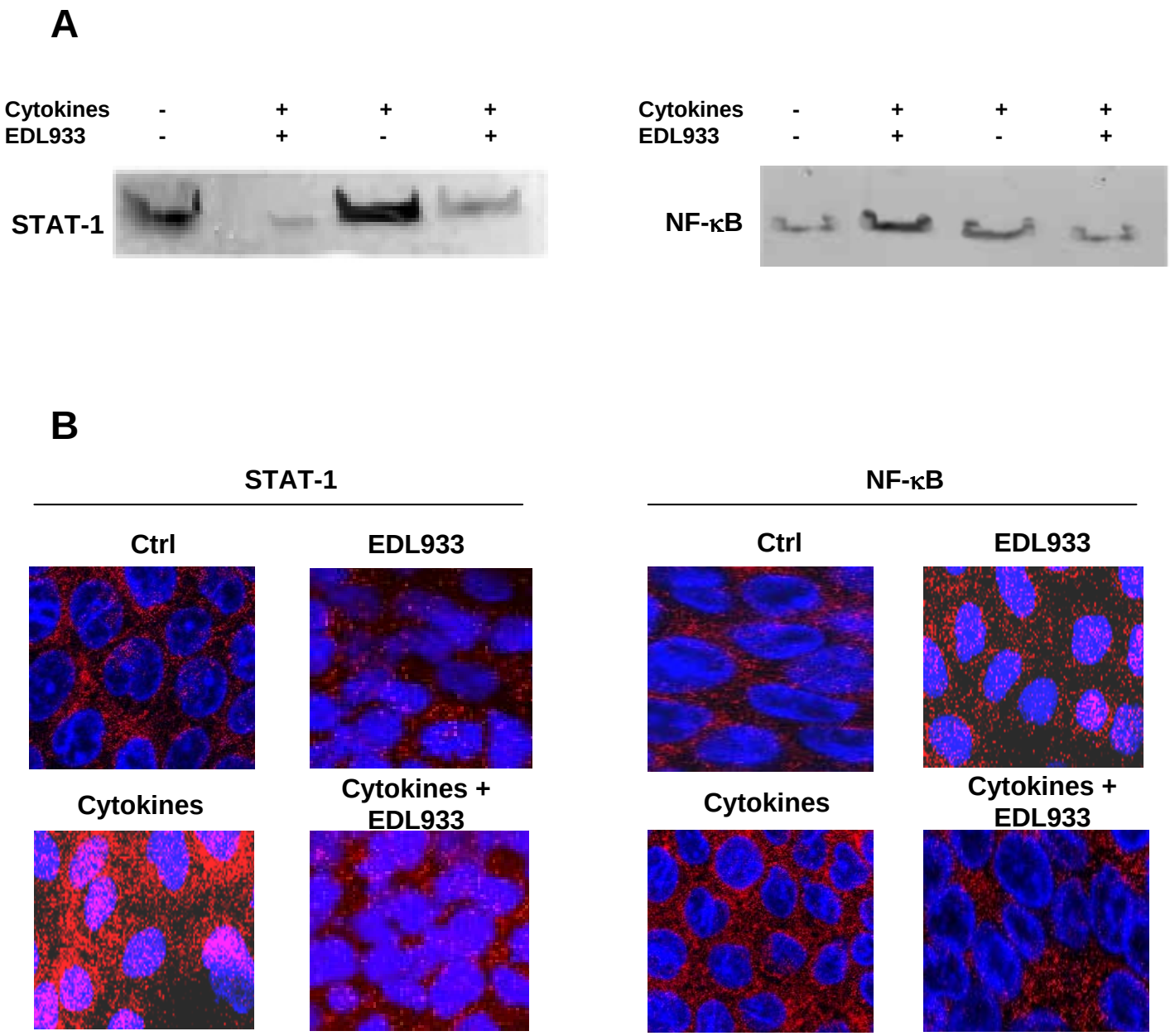
Pour cela, nous avons utilisé une approche pharmacologique. Les cellules Hct-8 ont été incubées avec les différents inhibiteurs, stimulées avec les cytokines (IFN-γ, TNF-α, IL-1β) pendant 6 h et l'expression du gène de la iNOS a été analysée par RT-PCR et PCR semi-quantitative. L'expression des ARNm *iNOS* induite par les cytokines n'a pas été modifiée par l'utilisation de PD98059 (inhibiteurs des MAPKK), SB202190 (inhibiteur de la p38), Gö6983 (inhibiteur des PKC), wortmaninn (inhibiteur de PI3K), l'inhibiteur d'Akt et les inhibiteurs de NF-κB (Bay et MG132) (Fig. 4A). En revanche, l'expression des ARNm de la iNOS a été inhibée lorsque les cellules activées ont été traitées avec l'inhibiteur de Jak-2 ou l'inhibiteur de STAT-1 (Fig. 4A). De façon similaire, la production de NO a été inhibée lorsque les inhibiteurs JI et SI ont été ajoutés aux cellules activées tandis qu'aucune inhibition n'a été observée avec les autres inhibiteurs (Fig. 4B).

L'ensemble de ces résultats démontre que la voie Jak-2/STAT-1 est impliquée dans l'induction du gène de la iNOS par les cytokines dans les cellules épithéliales humaines.

IV-2. Modulation de NF-κB et de STAT-1 par les EHEC

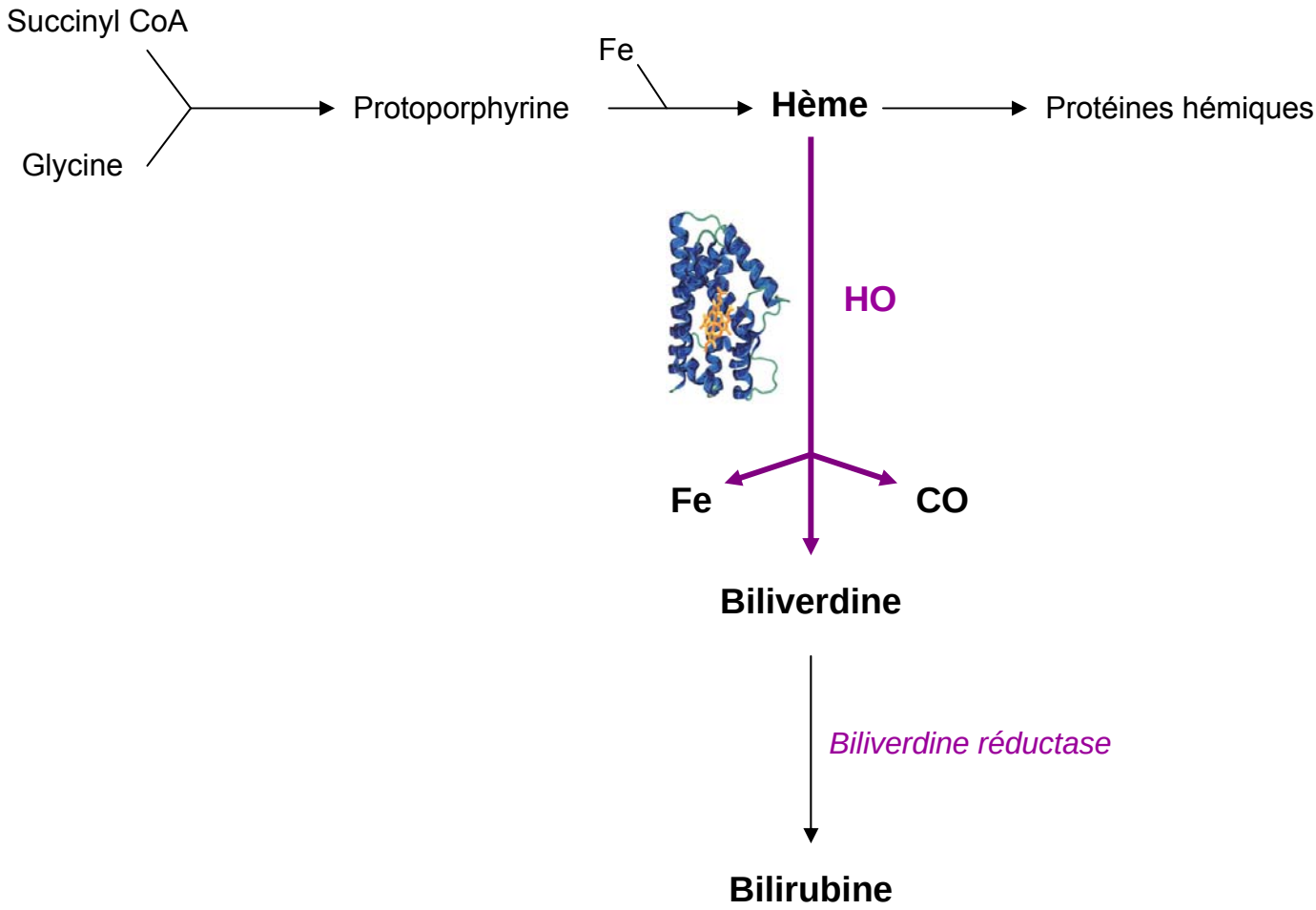
Compte-tenu des résultats ci-dessus, nous avons supposé que l'activation du facteur de transcription STAT-1 pouvait être modulée par les EHEC.

Figure 5: L'inhibition de la transcription du gène de la iNOS par les EHEC est dépendante de STAT-1



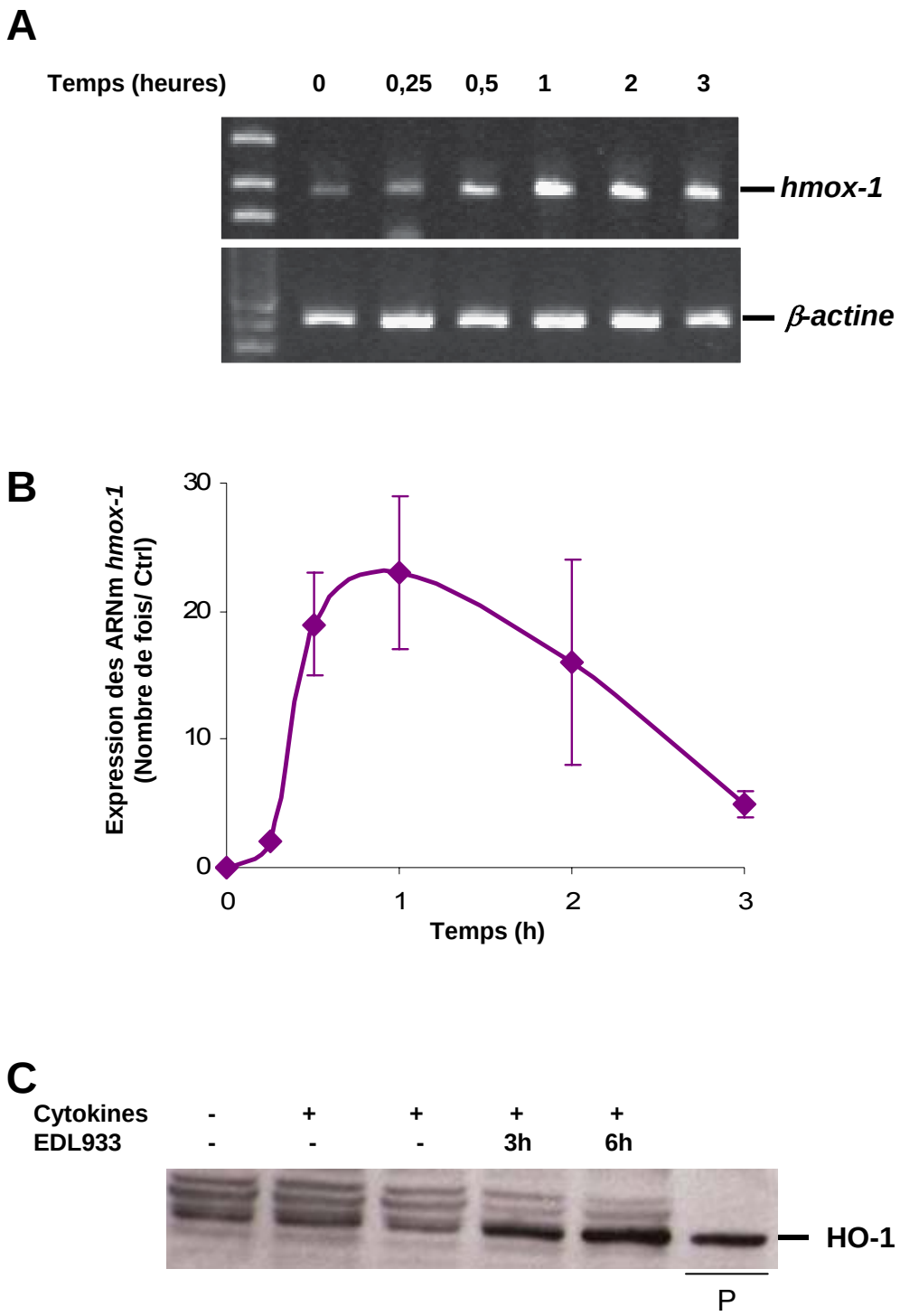
Les protéines nucléaires des cellules Hct-8 stimulées par les cytokines et/ou infectées par EDL933 ont été extraites et utilisées (2 μg) pour analyser l'activation de NF-κB et de STAT-1 par EMSA (A). (B) La localisation cellulaire de STAT-1 et NF-κB (rouge) a été observée par immunofluorescence. Les noyaux des cellules ont été marqués par le DAPI (bleu). La co-localisation des 2 marquages apparaît en rose.

Figure 6: Réaction enzymatique de l'HO



HO catalyse la dégradation de l'hème en biliverdine, fer (Fe) et monoxyde de carbone (CO). La biliverdine réductase catalyse la conversion de la biliverdine en bilirubine.

Figure 7: Induction de HO-1 par les EHEC



L'expression du gène *hmox-1* a été analysée par RT-PCR (A) et PCR en temps réel (B) dans les cellules Hct-8 infectées par EDL933 pendant différents temps; n = 4. (C) La présence de la protéine HO-1 a été analysée par Western-blot. P, contrôle positif. Données représentatives de deux expériences indépendantes.

Par EMSA, nous avons observé une augmentation de l'activation de STAT-1 quand les cellules ont été activées par les cytokines en comparaison des cellules non activées. Comme attendu, cette activation a été totalement inhibée quand la souche EDL933 a été ajoutée aux cellules activées (Fig. 5A). De façon intéressante, on a pu également noter que l'activation basale de STAT-1 dans les cellules non activées a été inhibée par EDL933.

D'autre part, l'activation de NF-κB a été faiblement induite par EDL933 et n'a pas été modifiée quand les cellules ont été traitées par les cytokines avec ou sans EDL933 en comparaison des cellules contrôles (Fig. 5A).

Ces résultats ont été confirmés par immunofluorescence et microscopie confocale (Fig. 5B). La translocation nucléaire de STAT-1 a été observée dans les cellules activées. L'ajout d'EDL933 à ces dernières a entrainé une inhibition de l'activation de ce facteur de transcription. Une translocation de NF-κB dans le noyau a été observée dans environ 10% des cellules infectées en réponse à l'infection par EDL933. Les cellules stimulées par les cytokines et/ou infectées par EDL933 ont présenté un marquage de NF-κB uniquement au niveau cytoplasmique de la même façon que les cellules contrôles.

Ces résultats démontrent que les EHEC inhibent l'activation de STAT-1 dans les cellules épithéliales stimulées par les cytokines.

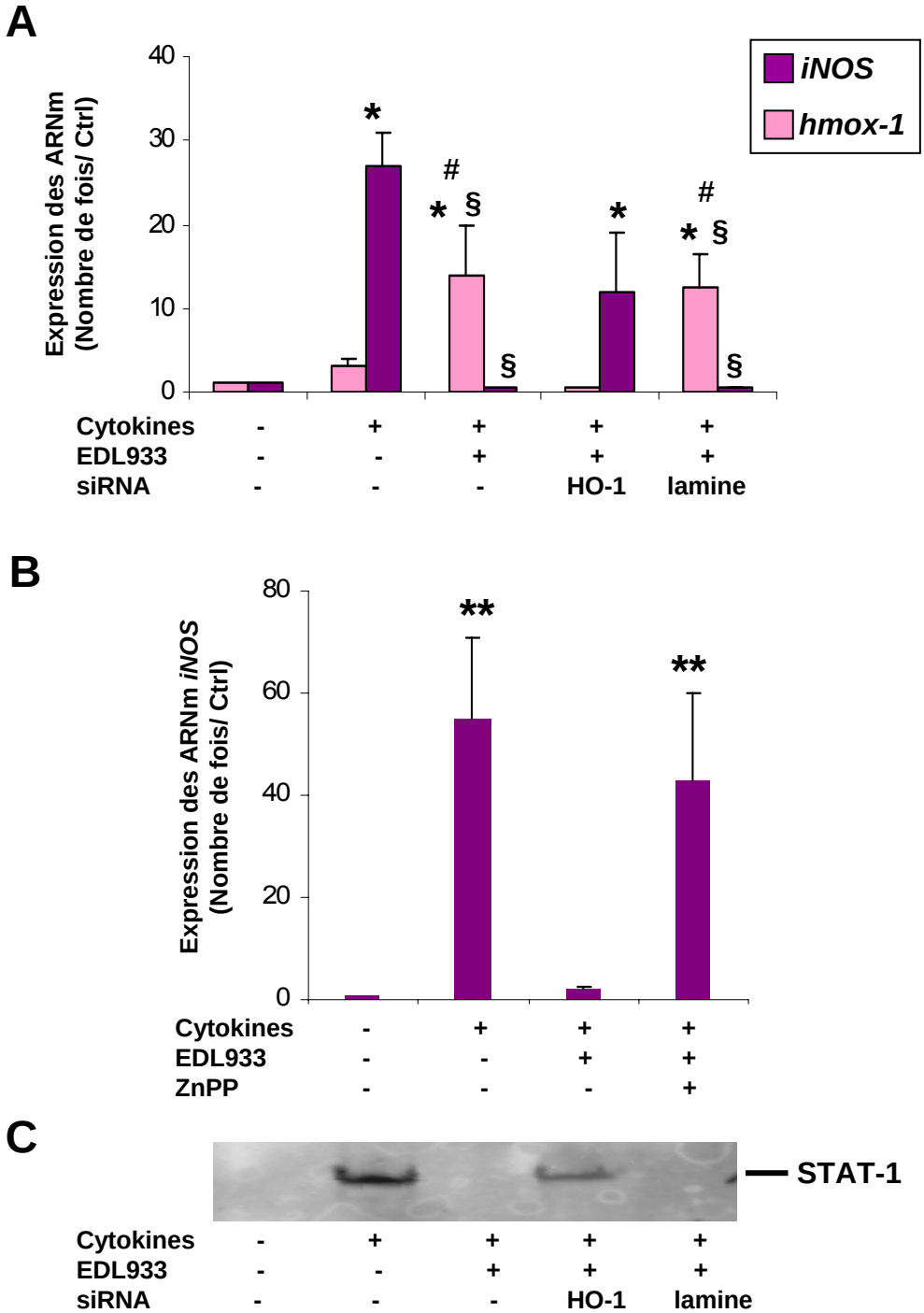
V. IMPLICATION DE HO-1 DANS L'INHIBITION DE L'INDUCTION DE LA iNOS

HO-1 est une enzyme qui catalyse la transformation de l'hème en CO, en fer, et en biliverdine convertie rapidement en bilirubine (Fig. 6). Ces produits possèdent de nombreuses propriétés anti-oxydantes et sont impliqués dans l'inhibition de la réponse inflammatoire et notamment en inhibant l'expression des ARNm de la iNOS dans différentes cellules (Lee TS and Chau LY, 2002; Ryter SW et coll., 2006). Nous avons donc suggéré que les EHEC pouvaient induire HO-1 dans les cellules épithéliales, et que cette enzyme pouvait inhiber en retour la production de NO.

V-1. Les EHEC induisent HO-1 dans les cellules épithéliales humaines

Nous avons analysé l'expression de *hmox-1* dans les cellules Hct-8 en réponse à la souche EDL933 par RT-PCR (Fig. 7A) et PCR quantitative (Fig. 7B). L'expression du gène *hmox1* a été induite par EDL933 0,5 h post-infection et a atteint un pic à 1 h après l'infection, puis a diminuée à partir de 2 h après l'infection. De plus, l'expression de *hmox-1* n'a pas été modulée par EcG1, EcG2 ou DH5α (Résultats non montrés).

Figure 8: HO-1 inhibe la transcription du gène de la iNOS dans les cellules épithéliales activées



(A) Les cellules ont été transfectées ou non avec un siRNA HO-1 ou lamine puis stimulées avec les cytokines, en présence ou absence de EDL933. L'expression des ARNm de la *iNOS* (6 h) et *hmox-1* (2 h) ont été analysés par PCR en temps réel. *, $P<0,05$; **, $P<0,01$ par rapport aux cellules contrôles; §, $P<0,05$ *vs.* les cellules stimulées avec les cytokines; #, $P<0,05$ en comparaison des cellules activées, infectées et traitées avec siRNA HO-1; n = 3-4. (B) les cellules stimulées ont été infectées avec EDL933 en présence ou absence de ZnPP et le niveau d'expression du gène de la iNOS a été analysé par PCR en temps réel. *, $P<0,05$ *vs*. les cellules contrôles; n = 4. (C) Les cellules ont été traitées comme en (A) pendant 3 h. L'activation de STAT-1 a été analysée par EMSA.

De façon similaire, la protéine HO-1 a été induite à 3 h et 6 h par les EHEC (Fig. 7C). Les cytokines seules n'induisent pas la synthèse de HO-1.

V-2. L'inhibition de HO-1 dans les cellules activées restaure l'induction de la iNOS

Pour démontrer le rôle de HO-1 dans l'inhibition de l'expression du gène codant pour la iNOS dans les cellules épithéliales, nous avons utilisé la technique des siRNA. Pour cela, les cellules sont mises en présence des siRNA HO-1 ou des siRNA lamine (utilisés comme contrôles) puis ont été stimulées par les cytokines et infectées par la souche EDL933. L'expression des ARNm *hmox1* et *iNOS* a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats montrent que l'expression de *hmox-1* dans les cellules infectées par EDL933 a été complètement inhibée avec l'utilisation de siRNA HO-1; cette inhibition a été associée de façon concomitante à la restauration partielle de l'expression des ARNm de la iNOS. Le siRNA lamine n'a pas eu d'effet sur la transcription des gènes codant pour HO-1 et la iNOS (Fig. 8A).

Pour confirmer le lien entre l'induction de HO-1 par les EHEC et l'inhibition du gène de la iNOS par les EHEC, nous avons utilisé un inhibiteur de HO-1, le ZnPP, dans des co-cultures de cellules Hct-8/EDL933. En présence de ZnPP, les EHEC n'ont pas induit d'inhibition de l'expression des ARNm de la *iNOS* dans les cellules épithéliales activées (Fig. 8B).

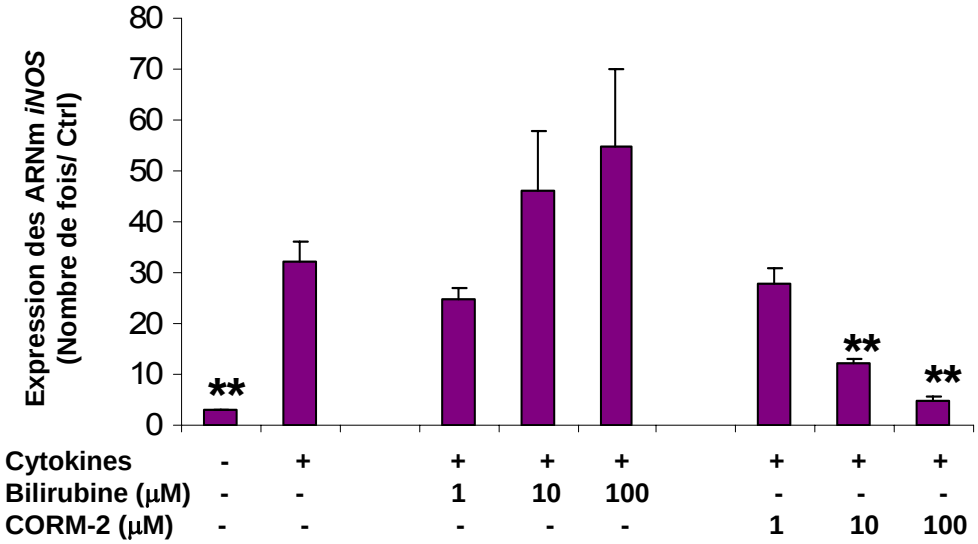
Pour terminer, nous avons montré que l'activation de STAT-1 a été partiellement restaurée quand les cellules activées et infectées ont été traitées avec un siRNA HO-1. Aucun effet n'a été observé avec un siRNA lamine (Fig. 8C).

En conclusion, l'ensemble de ces données démontre que les EHEC induisent HO-1 qui en retour inhibe l'activation de STAT-1 et donc la transcription inductible du gène codant pour la iNOS.

V-3. Effet des principaux produits de HO-1 sur l'induction de la iNOS

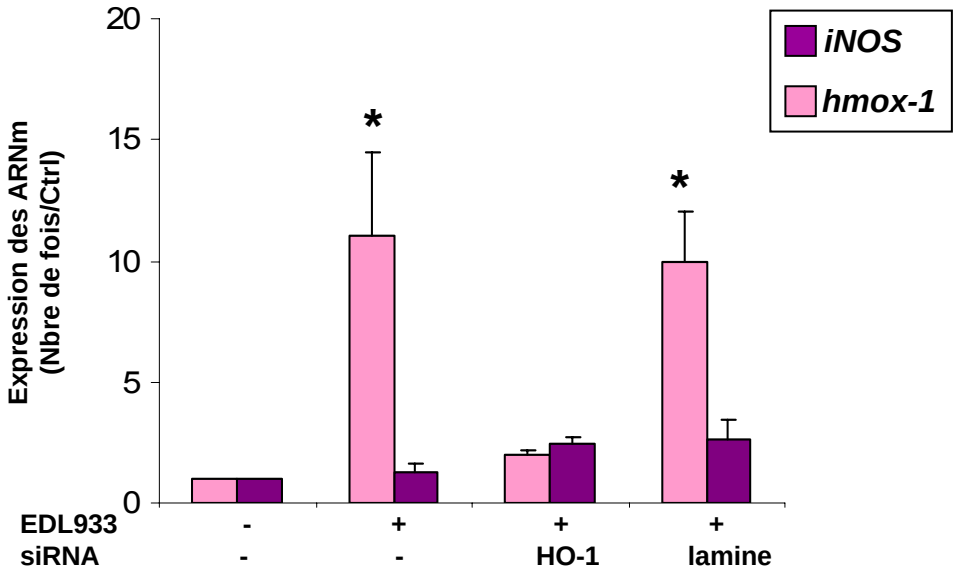
Pour déterminer par quel mécanisme HO-1 inhibe l'expression des transcripts de la iNOS, nous avons traité les cellules activées avec les deux principaux produits de HO-1, la bilirubine et le CO par l'intermédiaire de CORM-2. L'expression des ARNm dans les cellules activées n'a pas été modulée par l'ajout de bilirubine de 1 à 100 μM. En revanche, l'ajout de CORM-2 a entrainé une inhibition de l'induction de la iNOS de façon dose-dépendante dans les cellules stimulées (Fig. 9), établissant que le CO interfère avec l'expression de la iNOS dans les cellules épithéliales intestinales Hct-8.

Figure 9: CO est un régulateur de l'expression de la iNOS



Les cellules Hct-8 ont été stimulées pendant 6 h avec des cytokines en présence ou absence de différentes concentrations en bilirubine ou CORM-2. L'expression des ARNm a été analysée par PCR en temps réel. **, *P*<0,01 *vs*. les cellules stimulées; n = 3.

Figure 10: Effet de HO-1 sur l'induction de la iNOS dans les cellules épithéliales non activées



Les cellules Hct-8 ont été transfectées ou non avec un siRNA HO-1 ou lamine, puis infectées avec la souche EDL933. L'expression des ARNm *hmox-1* (2 h) et *iNOS* (6 h) a été analysée par PCR en temps réel. *, *P*<0,05 *vs.* les cellules contrôles et les cellules infectées et traitées avec siRNA HO-1;n = 3-5.

V-4. HO-1 ne régule pas la iNOS dans les cellules non activées

Nous avons montré que les EHEC n'induisent pas la iNOS dans les cellules Hct-8 (Fig. 2). En revanche, ces cellules expriment le facteur HO-1 en réponse aux EHEC, indépendamment du traitement par les cytokines. Puisque HO-1 inhibe l'induction de la iNOS, nous avons émis l'hypothèse que les EHEC régulent l'expression des ARNm codant pour la iNOS en induisant HO-1 dans les cellules épithéliales non stimulées. Nous avons donc inhibé les ARNm *hmox-1* par des siRNA dans des cellules Hct-8 infectées par EDL933 et analysé les transcrits du gène de la iNOS.

Les résultats montrent que l'expression de *hmox-1* a été augmentée d'environ 11 fois dans les cellules infectées par EDL933 par rapport aux cellules non infectées ; cette induction a été complètement inhibée par l'ajout d'un siRNA HO-1. Aucun effet n'a été observé avec un siRNA lamine. Cependant, l'expression des ARNm de la *iNOS* n'a pas été induite dans les cellules infectées avec les EHEC en présence ou absence de siRNA HO-1 ou lamine (Fig. 10).

V-5. L'HO des EHEC n'a pas d'effet sur l'induction de la iNOS

Les EHEC possèdent une enzyme HO qui est codée par le gène *chuS.* Nous avons supposé que l'HO des EHEC pouvait réprimer l'induction de la iNOS. Nous avons construit un mutant Δ*chuS* dans la souche EDL933 pour stimuler les cellules épithéliales. Nous n'avons pas observé de différence d'expression des ARNm *iNOS* et *hmox-1* entre les cellules infectées par EDL933 ou par le mutant isogénique Δ*chuS*. L'HO des EHEC ne module donc pas l'induction de la iNOS dans les cellules épithéliales activées (Fig. 11).

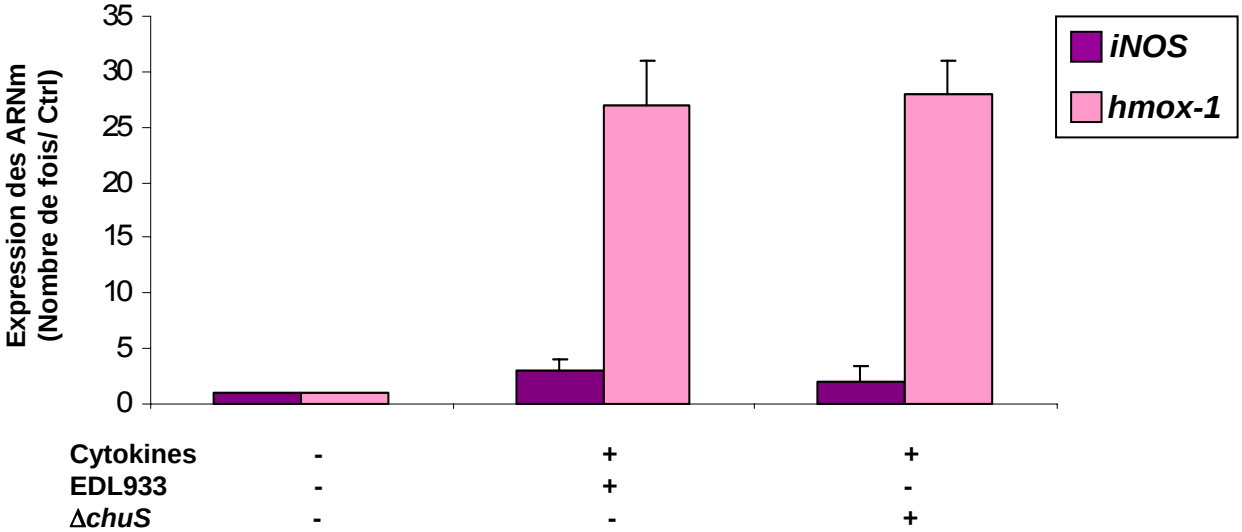
VI. VERS L'IDENTIFICATION DU FACTEUR BACTÉRIEN RESPONSABLE DE L'INHIBITION DU GÈNE DE LA iNOS

VI-1. Effet du contact bactéries/cellules

Pour déterminer si le contact entre les EHEC et les cellules épithéliales activées est nécessaire à l'inhibition de la production de NO par les EHEC, les bactéries ont été séparées des cellules épithéliales par une membrane de type Transwell 0,2 µm lors des infections. Les résultats ont montré que la production de NO induite par les cytokines a été inhibée de façon significative par les EHEC dans ces conditions (Fig. 12A).

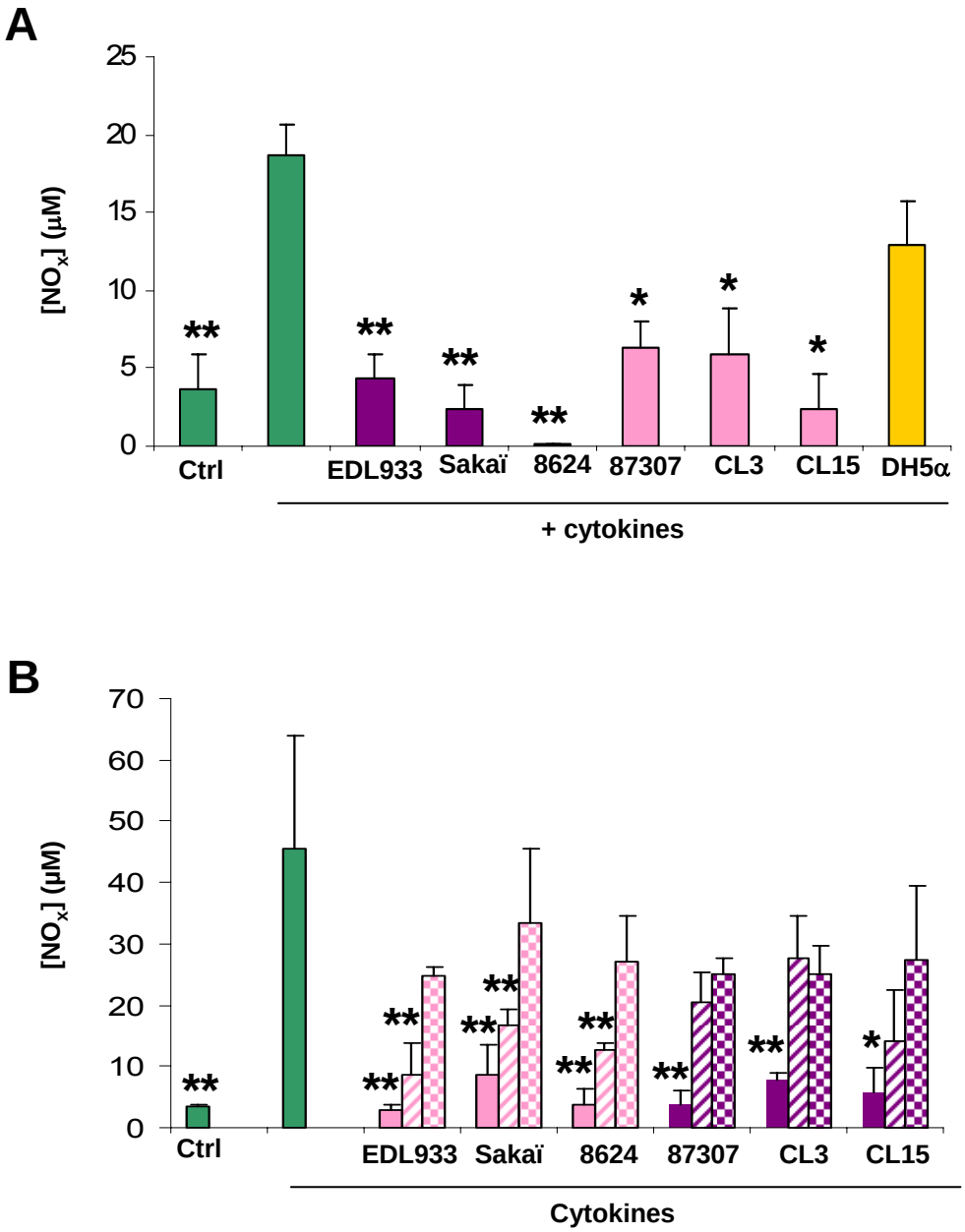
Par ailleurs, nous avons recherché l'effet de surnageants bactériens sur la production de NO par les cellules activées. Ces derniers ont été obtenus en cultivant des souches de EHEC sérotype O157:H7 et O113:H21 pendant 6 h dans le milieu de culture des cellules

Figure 11: Effet de l'HO des EHEC



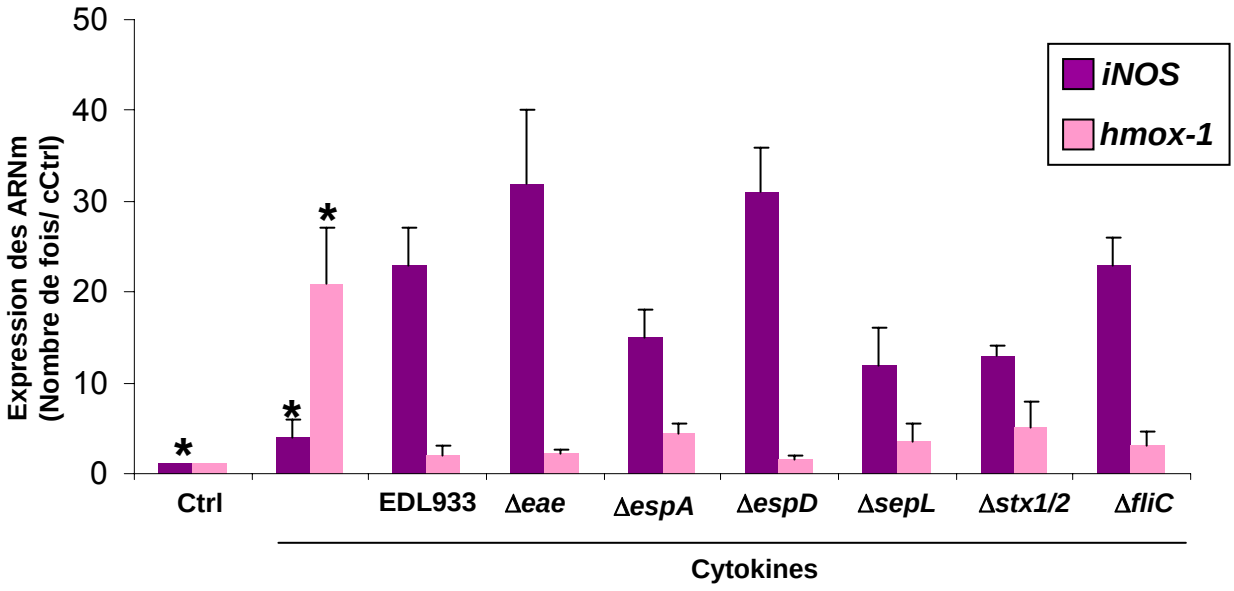
Les cellules Hct-8 ont été stimulées par les cytokines en présence ou absence de EDL933 ou EDL933 Δ*chuS*. L'expression des ARNm *hmox-1* (2 h) et *iNOS* (6 h) a été analysée par PCR en temps réel; n = 3.

Figure 12: Le contact EHEC/bactéries n'est pas nécessaire à l'inhibition de l'induction de la iNOS



Les cellules Hct-8 activées ont été infectées par les EHEC sur membrane filtrante 0,2 µm (A) ou traitées par des surnageants bactériens purs (barres pleines), dilués au ½ (barres hachurées) ou au ¼ (barres pointillées) pendant 6 h (B). [NOx] a été mesurée 18 h après la fin de l'infection. *, *P*<0,05; **, *P*<0,01 en comparaison des cellules stimulées avec les cytokines; n = 3-5.

Figure 13: L'inhibition de l'induction de la iNOS n'est pas dépendante de l'adhésion, du SSTT, de la flagelline ni de Stx



Les cellules Hct-8 activées ont été infectées avec EDL933 ou les mutants isogéniques Δ*espA*, Δ*espD*, Δ*sepL*, Δ*eae*, Δ*stx1/2* et Δ*fliC.* L'expression relative du gène *hmox-1* et *iNOS* a été mesurée par PCR en temps réel après respectivement 2h et 6h d'infection. *, *P*<0,05 en comparaison des cellules infectées par les différentes bactéries; n = 3-4.

épithéliales ; ces surnageants ont été ensuite filtrés sur membrane 0,2 µm. Une inhibition significative de la production de NO a été constatée lorsque les surnageants bactériens ont été utilisés purs ou dilués au 1/2 (sauf pour les souches O113:H21 CL3, CL15 et 87307), mais pas dilués au 1/4 (Fig. 12B).

Ces résultats sont des arguments pour supposer que le contact bactéries/cellules n'est pas nécessaire à l'inhibition de la production de NO par les EHEC. Ces bactéries libèrent donc un facteur soluble responsable de l'activité inhibitrice.

VI-2. Implication des principaux facteurs de virulence

Les cellules activées ont été infectées par la souche EDL933 ou par des mutants isogéniques invalidés pour les gènes codant pour des facteurs d'adhésion (Eae), le SSTT (EspA, EspD, SepL), la flagelline ou Stx1 et Stx2. Les mutants Δ*espA*, Δ*espD*, Δ*sepL*, Δ*eae*, Δ*fliC* et le double mutant Δ*stx1/2* ont inhibé l'expression des ARNm de la *iNOS* et induisent l'expression du gène *hmox-1* dans les cellules épithéliales de façon similaire à la souche sauvage (Fig. 13).

En conséquence, l'induction de HO-1 et l'inhibition de la production de NO ne sont pas dépendantes de l'adhésion intime des bactéries aux cellules, du SSTT, de la flagelline ni des Stx1 et 2.

VI-3. Identification du facteur bactérien par criblage d'une banque de mutants

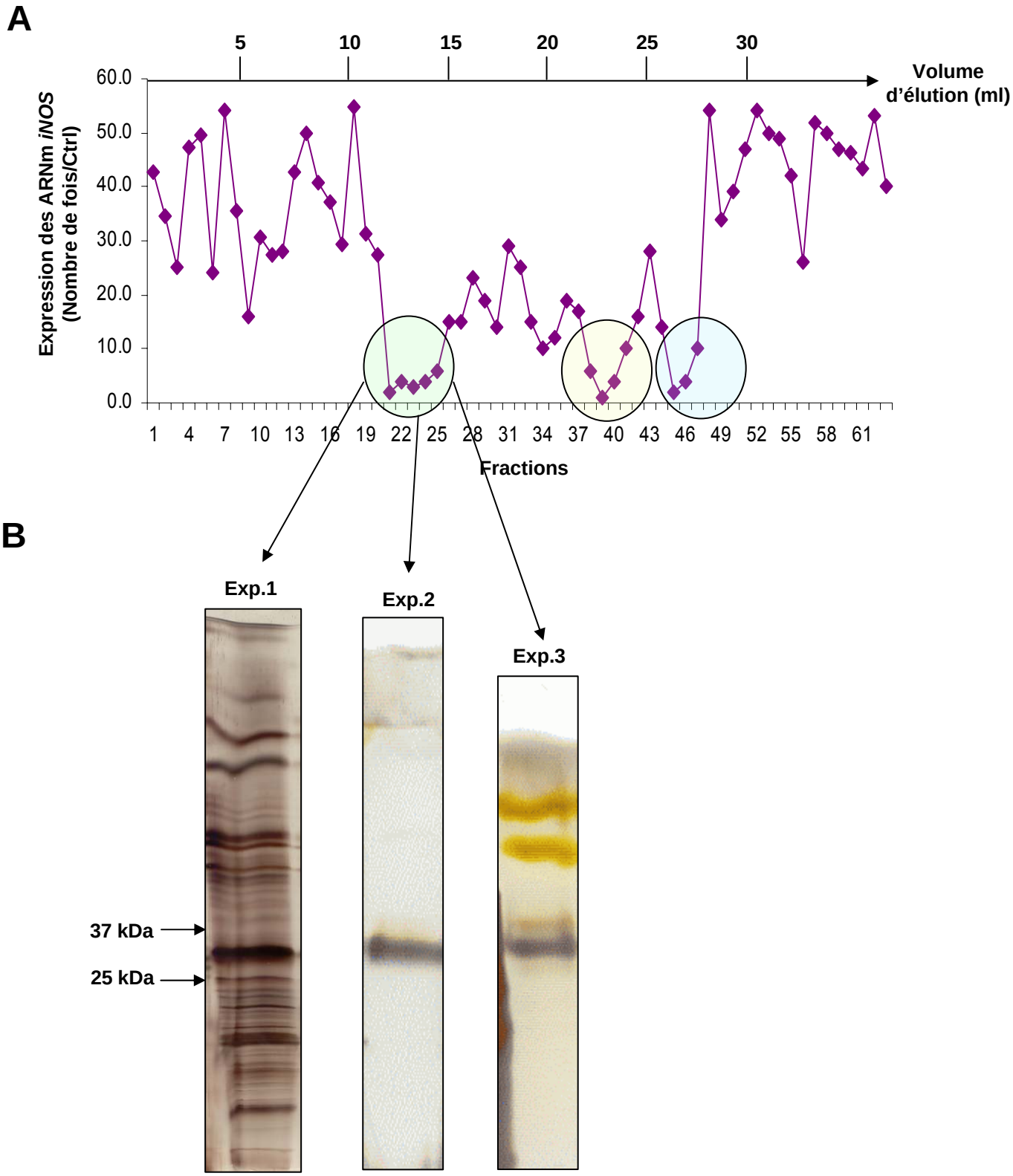
Nous avons criblé sur les cellules épithéliales stimulées par les cytokines, 656 mutants issus d'une banque de mutants aléatoires réalisée à partir de la souche EDL933 dans notre laboratoire. Les cellules contrôles et stimulées par les cytokines produisent respectivement environ 1 et 25 µM de NO en plaque de 96 puits. Lorsque la souche EDL933 ou les mutants aléatoires ont été ajoutés aux cellules stimulées, nous avons observé une diminution importante de la production de NO (résultats non montrés). Par ailleurs, la souche DH5α n'a pas inhibé la production de NO.

Ainsi, aucun des mutants testés jusqu'à présent n'est déficient pour un facteur impliqué dans l'inhibition de l'expression du gène codant pour la iNOS.

VI-4. Identification du poids moléculaire du facteur bactérien

Les facteurs bactériens d'un surnageant d'EDL933 possédant une activité inhibitrice sur la production de NO ont été séparés en fonction de leur poids moléculaire en utilisant des unités Vivaspin (Sartorius).

Figure 14: Profil d'élution chromatographique



(A) Les facteurs solubles de EDL933 ont été séparés sur colonne Sephadex G75 à partir d'un surnageant de culture de 6 h. Les différentes fractions (0,5 ml) ont été collectées et ajoutées aux cellules Hct-8 activées. L'expression des ARNm a été analysée par PCR en temps réel. (B) Les fractions inhibitrices (21-25) de 3 expériences indépendantes ont été séparées par SDS-PAGE et colorées au nitrate d'argent.

Nous avons ainsi obtenu 3 fractions. La première contient toutes les molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 100 kDa, la seconde, toutes les molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 10 kDa, et la dernière, toutes les molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 3 kDa. Les cellules Hct-8 ont été stimulées par les cytokines et infectées avec ces 3 fractions. Seule la fraction 1 contenant toutes les molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 100 kDa est capable d'inhiber la production de NO à 24 h par rapport aux cellules stimulées non infectées (Résultats non montrés). Ces données suggèrent que le facteur bactérien a un poids moléculaire compris entre 10 et 100 kDa.

VI-5. Séparation chromatographique

Les facteurs bactériens de surnageants de culture de la souche EDL933 ont été séparés par chromatographie d'exclusion sur colonne Séphadex G75, en collaboration avec Ouali A. (Unité de Qualité des Produits Animaux, INRA, Centre de Theix). Cette colonne permet une séparation en fonction du poids moléculaire. Toutes les fractions obtenues ont été ajoutées aux cellules épithéliales activées pendant 6 h et l'expression des ARNm *iNOS* a été analysée par PCR en temps réel. Comme montré sur la Fig. 14A, une activité inhibitrice a été observée pour les fractions 21 à 25, 38 à 41 et 45 à 47.

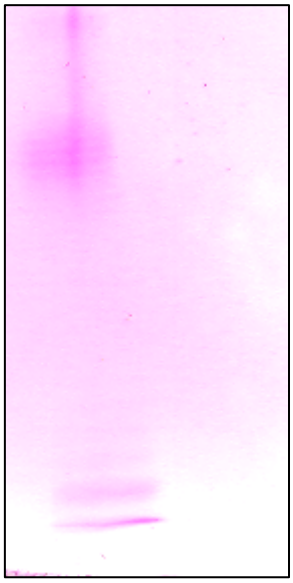
Par la suite, nous avons choisi de travailler uniquement sur les fractions 21-25 puisque ces fractions ont présenté une activité inhibitrice identique dans trois expériences indépendantes. Ces fractions ont été regroupées, lyophilisées afin de les concentrer et séparées sur gel de polyacrylamide 10%-SDS. La coloration au nitrate d'argent a révélé une bande majoritaire à ~ 30 kDa, plus ou moins pure selon les expériences réalisées (Fig. 14B). En parallèle, une coloration au bleu de Coomassie a été réalisée et aucune bande n'a été détectée.

Nous avons tenté d'identifier ce facteur bactérien par spectrométrie de masse à la plate-forme protéomique de notre centre INRA. Néanmoins, aucune protéine identifiée dans les banques de données n'a été mise en évidence.

VI-6. Le facteur bactérien n'est pas un sucre

Les résultats obtenus en spectrométrie de masse suggèrent que le facteur bactérien responsable de l'inhibition de la iNOS n'est pas une protéine. Nous avons alors émis l'hypothèse d'un sucre qui est révélée par la coloration au nitrate d'argent. La fraction inhibitrice concentrée '21-25' et du LPS, servant de contrôle positif, ont été séparés sur gel de polyacrylamide et colorés par le réactif de Schiff.

Figure 15: Mise en évidence de la présence des sucres



La fraction inhibitrice (100 μl) et du LPS ont été séparés par SDS-PAGE et colorés par le réactif de Schiff.

Plusieurs bandes colorées en rose ont été observées pour le LPS tandis qu'aucune bande n'a été mise en évidence pour la fraction inhibitrice (Fig. 15).

DISCUSSION

Les résultats présentés dans ce chapitre démontrent que les EHEC sont capables de moduler la réponse immune innée via l'induction de HO-1. Ces données constituent la première description de l'induction de HO-1 par des agents microbiens pathogènes. Par ailleurs, bien que de nombreux travaux montrent que *i*) HO-1 est impliqué dans l'inhibition de la réponse inflammatoire (Lee TS and Chau LY, 2002; Nakahira K et coll., 2006) et dans l'inhibition de l'induction de la iNOS (Svensson L et coll., 2008), et *ii*) des bactéries pathogènes peuvent limiter la production de NO, nous avons établi que les EHEC inhibent la production de NO en induisant HO-1 dans des cellules épithéliales humaines activées.

Dans nos conditions expérimentales, nous avons tout d'abord observé que les EHEC ne modulent pas l'expression du gène codant pour la iNOS dans les cellules épithéliales, contrairement à des bactéries entéroinvasives telles que *E. coli, S. dublin* ou *S. flexneri* (Witthoft T et coll., 1998; Resta-Lenert S and Barrett KE, 2002). Cependant, dans leur article, Witthoft et coll. montrent que les cellules Caco-2 produisent plus de 100 µM de NO_2^- 3 h après le début de l'infection par *E. coli* O29:NM invasif (Witthoft T et coll., 1998) ; cette cinétique de synthèse de NO_2^- semble incompatible avec une production enzymatique de NO *via* la iNOS. Par ailleurs, ces cellules ont été cultivées dans le milieu RPMI 1640 qui contient environ 2 mM de NO_3^-. Nous supposons donc que les NO_2^- dosés correspondent à la dégradation des NO_3^- par la NO_3^- réductase de *E. coli* et non à l'induction de la iNOS. Il serait donc important de confirmer ces résultats dans un milieu dépourvu de NO_3^-, comme le milieu DMEM que nous avons utilisé.

En revanche, nous avons montré que les EHEC inhibent l'expression du gène codant pour la iNOS et la production de NO quand les cellules épithéliales sont activées par des cytokines pro-inflammatoires. Ces résultats ont été obtenus avec les cellules Hct-8, T84 et Caco-2, mais aucune production de NO_3^- n'a été induite dans les cellules HT-29. Inversement, Kolios et coll. (Kolios G et coll., 1995) ont montré une augmentation de NO_2^- de l'ordre du nM dans les cellules HT-29 après 48 h de stimulation par des cytokines pro-inflammatoires ; nous considérons que cette faible augmentation de $[NO_2^-]$ ne peut pas être attribuée à une activité iNOS. Nous avons par ailleurs envisagé que la diminution de la concentration en NO_3^- dans les surnageants de co-cultures EHEC/cellules Hct-8 activées pouvait être due à une activité des NO_3^- et NO_2^- réductases bactériennes ; néanmoins, cette

hypothèse est peu probable car *i*) les EHEC inhibent l'expression de la iNOS, *ii*) nous n'avons pas dosé de NO_2^- ni de NH_4 en fin de culture (résultats non montrés), *iii*) les EHEC, qui sont extracellulaires, ont été éliminés par des lavages après les 6 h d'infection et un milieu neuf contenant des antibiotiques a été utilisé pendant 18 h supplémentaires, et *iv*) des surnageants bactériens sur lesquels nous n'avons pas détecté d'activités réductases (résultats non montrés) ont inhibé la synthèse de NO.

Par ailleurs, l'inhibition de l'expression du gène *iNOS* par les souches d'EHEC n'a pas été retrouvée avec des souches d'*E. coli* commensaux, suggérant qu'un dialogue moléculaire particulier a été établi entre les EHEC et les cellules épithéliales intestinales humaines. L'inhibition de la production de NO par des bactéries pathogènes peut être considérée comme un mécanisme d'échappement de la réponse immune. À ce titre, de nombreux pathogènes sont capables d'inhiber le programme cellulaire de défense non spécifique. Ainsi, la protéase YopJ/P de *Yersinia* ou la phosphatase OspF de *Shigella* inhibent l'activation des MAPKs (Palmer LE et coll., 1998; Arbibe L et coll., 2007) ; de même les bactéries du genre *Salmonella* et *Shigella* empêchent l'ubiquitination de phospho-Iκ-B et donc l'activation de NF-κB (Neish AS et coll., 2000; Kim DW et coll., 2005). Par ailleurs, certains pathogènes sont capables d'inhiber la production de NO : L'arginase de *H. pylori* inhibe la production de NO par les macrophages par compétition de substrat (Gobert AP et coll., 2001) ; plus récemment, il a été également démontré que les EPEC inhibent l'expression de la iNOS dans les cellules épithéliales intestinales activées (Maresca M et coll., 2005).

En recherchant le mécanisme moléculaire impliqué dans l'inhibition de la production de NO, nous avons dans un premier temps démontré que l'activation du facteur de transcription STAT-1 est nécessaire pour l'induction de l'expression du gène codant pour la iNOS dans les cellules Hct-8 activées ; en effet, un inhibiteur de STAT-1 ou de JAK-2, mais pas de NF-κB, de la voie des MAPK, de la voie PI3K-Akt ni de la voie des PKC, a supprimé l'expression des ARNm de la *iNOS* induite par les cytokines. Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules épithéliales intestinales DLD-1 stimulées par l'IFN-γ, le TNF-α et l'IL-1β (Kleinert H et coll., 1998) ou sur les cellules épithéliales pulmonaires A549 (Ganster RW et coll., 2001). En revanche la non-implication de NF-κB pourrait sembler surprenante, mais il est reconnu que l'IFN-γ ne signale pas via NF-κB.

Dans un second temps, l'activité inhibitrice des EHEC sur la transcription du gène iNOS induite par des cytokines a été attribuée à une inactivation du facteur de transcription STAT-1. De façon similaire, Ceponis et coll. ont montré que les EHEC O157:H7 et O113:H21 inhibent

l'activation de STAT-1 induite par l'IFN-γ dans les cellules épithéliales intestinales. Cet effet est indépendant du LEE, du SSTT et de Stx1/2 (Ceponis PJ et coll., 2003). Par ailleurs, ce même groupe a décrit que tous les séropathotypes des EHEC, mais pas les EPEC, inhibent la phosphorylation de STAT-1 dans les cellules T84 et Hep-2 induites par IFN-γ (Jandu N et coll., 2007).

En revanche, Maresca et coll. ont montré que les EPEC suppriment la production de NO dans les cellules épithéliales Caco-2 activées par l'IFN-γ, le TNF-α et l'IL-1β en inhibant l'activation de NF-κB ; il est cependant important de noter que ces auteurs n'ont pas directement prouvé que NF-κB était impliqué dans la transcription inductible du gène de la iNOS dans leurs conditions expérimentales (Maresca M et coll., 2005). Néanmoins, les différences de résultats peuvent s'expliquer par les différentes techniques utilisées pour induire la iNOS (concentration en cytokines, temps de stimulation). Par ailleurs, on peut imaginer que les EPEC et les EHEC ont élaboré différentes stratégies pour limiter la production de NO. Ainsi, ces auteurs ont montré que l'effet inhibiteur des EPEC sur l'induction de la iNOS est dépendant du SSTT : un mutant Δ*sep-2*, qui ne possède pas un SSTT fonctionnel, n'inhibe plus l'expression de la *iNOS* induite par les cytokines (Maresca M et coll., 2005). En revanche, nos travaux établissent que le SSTT n'est pas impliqué dans l'inhibition de la production de NO par les EHEC car *i*) des souches EHEC O113:H21 LEE^{-} inhibent l'induction de la iNOS comme les souches O157:H7 LEE^{+} et *ii*) des mutants isogéniques n'ayant pas de SSTT fonctionnel ont le même effet inhibiteur que la souche parentale EDL933. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Ceponis et coll. (Ceponis PJ et coll., 2003).

Malgré les nombreuses approches expérimentales, nous n'avons pas identifié le facteur des EHEC responsable de l'inhibition de l'expression de la iNOS. C'est un composé de poids moléculaire de 10 à 100 kDa qui ne serait pas protéique. Cette donnée est en accord avec Jandu et coll. qui ont démontré que le facteur bactérien des EHEC responsable de l'inhibition de l'activation de STAT-1 est résistant à la chaleur et au traitement par des protéases (Jandu N et coll., 2006). En revanche, contrairement à nos résultats, ces auteurs ont démontré que l'activité inhibitrice est dépendante du contact bactéries/cellules ; en effet un surnageant bactérien n'a pas inhibé l'activation de STAT-1 dans les cellules T84 activées (Jandu N et coll., 2006). Ces surnageants ayant été obtenus dans les mêmes conditions que les nôtres, il est difficile d'expliquer ces différences de résultats. Néanmoins, nous n'avons pas montré que

les surnageants bactériens inhibent la voie de signalisation IFN-γ/STAT-1 mais suppriment la production de NO.

L'enzyme HO-1 métabolise l'hème en CO, fer et biliverdine qui est rapidement convertit en bilirubine. Outre son rôle dans la dégradation de l'hème, HO-1 joue un rôle critique dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Des souris déficientes pour HO-1 sont incapables de vivre normalement et meurent au plus tard à l'âge de 1 an en développant des signes d'inflammation chronique dans de nombreux organes (Poss KD and Tonegawa S, 1997). Ainsi, il a été proposé que HO-1 servirait de mécanisme adaptatif pour protéger la cellule d'un stress oxydatif (Poss KD and Tonegawa S, 1997). Dans ce contexte, une augmentation de l'expression de HO-1 a également été montrée dans l'athérosclérose, des gastrites à *Helicobacter pylori* et des colites ulcéreuses ; dans ces deux dernières pathologies inflammatoires, HO-1 a été immunodétectée à la superficie et dans les cryptes des cellules épithéliales. De plus, le rôle protecteur de HO-1 a été démontré dans un modèle de colite expérimental induit par du TNBS (Wang WP et coll., 2001; Paul G et coll., 2005), et dans des souris déficientes en IL-10 qui développent spontanément une colite (Hegazi RA et coll., 2005). L'activité HO-1 a été corrélée avec la diminution de la production de radicaux libres et l'inhibition de l'induction de la iNOS dans les tissus (Wang WP et coll., 2001). Ainsi, l'ensemble de ces résultats et nos données suggèrent que HO-1 pourrait être surexprimé dans les cellules épithéliales durant l'infection par les EHEC et pourrait moduler la réponse inflammatoire de l'hôte et la production de NO dans le côlon.

Nous avons établi que les EHEC inhibent l'activation de STAT-1 en induisant HO-1. Quand l'expression de *hmox-1* est inhibée par les siRNA, on observe une restauration partielle de l'activation de STAT-1 et de l'expression des ARNm de la *iNOS*. Cependant, quand l'activité de HO-1 a été bloquée par le ZnPP, la transcription du gène codant la iNOS n'a pas été entièrement restaurée. Nous émettons donc l'hypothèse que les isoformes constitutives de HO, HO-2 et HO-3 pourraient être impliquées dans l'inhibition de la voie de signalisation STAT/iNOS. Néanmoins, on peut supposer que les EHEC suppriment l'activation de STAT-1 par d'autres mécanismes que l'induction de HO-1 ou inhibent la transcription du gène de la iNOS par une action sur d'autres facteurs de transcription.

De façon intéressante, les EHEC O157:H7 expriment une HO codée par le gène *chuS*. Ce gène est présent chez d'autres pathogènes tels que *Corynebacterium diphtheriae* ou *Neisseria meningitides*, mais n'est pas retrouvé chez les souches de *E. coli* non pathogènes. Il a été décrit que des enzymes bactériennes peuvent inhiber la production de NO par des

cellules eucaryotes (Gobert AP et coll., 2001). Nous avons construit un mutant Δ*chuS* dans la souche EDL933 afin de déterminer l'implication de HO bactérienne dans l'induction de la iNOS. Nous n'avons trouvé aucune différence dans le niveau d'expression de ce gène dans les cellules infectées avec EDL933 ou avec le mutant isogénique Δ*chuS*, en présence ou absence de cytokines. Ces résultats démontrent que l'HO des EHEC ne module pas l'expression du gène *iNOS* dans les cellules épithéliales humaines. Notons cependant que l'expression du gène *chuS* a été augmentée lorsque la souche EDL933 a été exposée au NO (Chapitre 2, Tableau 3) ; de ce fait, une augmentation de l'activité HO bactérienne pourrait avoir un effet sur l'expression de la iNOS.

Les produits de dégradation de l'hème par HO-1 possèdent des propriétés anti-oxydantes et pourrait être des médiateurs de la réponse anti-inflammatoire dépendante de HO-1. Des études ont montré l'effet protecteur de la biliverdine lors du choc septique chez le rat, notamment en diminuant l'expression des gènes codant pour l'IL-6, MCP-1, iNOS et COX-2 (Overhaus M et coll., 2006). Le CO possède également de nombreuses propriétés anti-inflammatoires. Il a été montré *in vivo* et *in vitro* que CO inhibe l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-α et IL-1β induite par le LPS et d'induire l'expression de gènes codant pour des cytokines anti-inflammatoires telle que IL-10 (Otterbein LE et coll., 2000). Récemment, il a été montré que le donneur de CO, CORM-2, diminue l'expression des gènes codant pour IL-8, IL-6 et iNOS dans les cellules Caco-2 stimulées par des cytokines (IFN-γ, TNF-α et l'IL-1β) ; cet effet anti-inflammatoire de CO se fait *via* une inhibition de NF-κB (Megias J et coll., 2007). De plus, il a été décrit que HO-1 inhibe l'activation STAT-1 dans des cellules endothéliales murines stimulées par IFN-γ via la bilirubine (Wu J et coll., 2005). Néanmoins, nos résultats indiquent que la bilirubine n'a pas d'effet sur l'expression de la *iNOS* dans les cellules Hct-8 traitées par les cytokines ; en revanche, l'induction de la iNOS a été inhibée par CORM-2. Nous proposons donc que CO est le régulateur principal de l'expression de la iNOS dans les cellules épithéliales activées en réponse aux EHEC.

Nous démontrons pour la première fois qu'une bactérie pathogène est capable d'inhiber la production de NO en induisant HO-1 dans des cellules épithéliales humaines activées. L'inhibition de la production de NO par des bactéries pathogènes est un dogme plutôt surprenant si on considère que *i*) d'autres bactéries induisent la iNOS (Resta-Lenert S and

Barrett KE, 2002) et *ii*) dans le système de co-évolution hôte/pathogène, l'homme a élaboré des mécanismes de défense pour lutter contre les infections.

Dans les chapitres précédents, nous avons démontré que le NO peut agir comme inhibiteur de la synthèse de Stx2 et de l'adhésion des EHEC en régulant l'expression du LEE, sans affecter la survie ni la croissance des bactéries. Nous proposons maintenant que les EHEC inhibent la production de NO pour favoriser l'adhésion aux cellules épithéliales et leur production de Stx, et donc leur propre virulence. Nous décrivons ainsi un nouveau mécanisme d'échappement de la réponse immune innée mucosale élaboré par les EHEC.

PERSPECTIVES

Dans ce chapitre, nous avons démontré que les EHEC sont capables d'inhiber la production de NO, via une induction de HO-1, dans les cellules épithéliales. Cependant, à ce jour, nous n'avons pas identifié le facteur bactérien responsable de cette inhibition. Les études préliminaires ont montré que ce facteur bactérien ne serait ni une protéine ni un sucre. Deux stratégies pour l'identification du facteur bactérien peuvent être envisagées : *i*) analyser la présence de lipides dans la fraction inhibitrice par une collaboration avec des spécialistes ; *ii*) finir de cribler la banque de mutants.

Par ailleurs, nous avons montré que l'induction de HO-1 par les EHEC conduit à une inhibition de l'activation STAT-1 et de la production de NO. Il serait intéressant de déterminer si les EHEC, via HO-1, sont capables de moduler d'autres voies de signalisations (notamment la voie NF-κB) et d'inhiber la production de médiateurs de la réponse innée (cytokines/chimiokines pro-inflammatoires comme l'IL-8, CCL20).

Enfin, nous souhaiterions analyser la transduction du signal induite par les EHEC conduisant à l'expression du gène *hmox-1* dans les cellules épithéliales. Pour cela, *i*) l'expression des ARNm *hmox-1* sera analysée dans les cellules activées et infectées en présence d'inhibiteurs pharmacologiques de différentes voies de signalisation et *ii*) l'activation du (des) facteur(s) de transcription impliqué(s) dans la transcription de *hmox-1* en réponse aux EHEC sera analysée par EMSA.

PUBLICATION n°2 :

HEME OXYGENASE-1 IS A CRITICAL REGULATOR OF NO PRODUCTION IN ENTEROHEMORRHAGIC *Escherichia coli*-INFECTED HUMAN ENTEROCYTES

J. IMMUNOL. 2008, 180: 5720-5726.

Heme Oxygenase-1 Is a Critical Regulator of Nitric Oxide Production in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*-Infected Human Enterocytes[1]

Marjolaine Vareille,* François Rannou,[2†] Natacha Thélier,[2†] Anne-Lise Glasser,‡ Thibaut de Sablet,* Christine Martin,* and Alain P. Gobert[3]*

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) are the causative agent of hemolytic-uremic syndrome. In the first stage of the infection, EHEC interact with human enterocytes to modulate the innate immune response. Inducible NO synthase (iNOS)-derived NO is a critical mediator of the inflammatory response of the infected intestinal mucosa. We therefore aimed to analyze the role of EHEC on iNOS induction in human epithelial cell lines. In this regard, we show that EHEC down-regulate IFN-γ-induced iNOS mRNA expression and NO production in Hct-8, Caco-2, and T84 cells. This inhibitory effect occurs through the decrease of STAT-1 activation. In parallel, we demonstrate that EHEC stimulate the rapid inducible expression of the gene *hmox-1* that encodes for the enzyme heme oxygenase-1 (HO-1). Knock-down of *hmox-1* gene expression by small interfering RNA or the blockade of HO-1 activity by zinc protoporphyrin IX abrogated the EHEC-dependent inhibition of STAT-1 activation and iNOS mRNA expression in activated human enterocytes. These results highlight a new strategy elaborated by EHEC to control the host innate immune response. ***The Journal of Immunology,*** **2008, 180: 5720–5726.**

Infection with enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)[4] may lead to diseases ranging from watery diarrhea to life-threatening complications such as hemolytic-uremic syndrome, the main cause of acute renal failure in children worldwide. Human infection occurs by ingestion of contaminated food derived from rearing animals, including meat, milk, or soiled vegetables (1). EHEC reach and colonize the lower intestine, initiating the formation of attaching and effacing lesions to the epithelium and the development of a mucosal innate immune response. Clinical data have established that type 1 cytokines and chemokines are over-expressed in EHEC-infected patients (2, 3). More particularly, an elevated ratio between pro- and anti-inflammatory cytokines is a reliable marker of the severity of EHEC infection and development of hemolytic-uremic syndrome (4, 5). Therefore, the capacity of bacteria to modulate the enterocyte innate immune response may be a critical step in pathogenesis.

Enterocytes are the first cells in contact with EHEC. This interaction yields to the locus of enterocyte effacement (LEE)-dependent structural modifications of the epithelium, i.e., attaching/effacing lesions, and to the development of a nonspecific defense program. In vitro studies have highlighted that EHEC induce the synthesis of chemokines and cytokines in human epithelial cell lines (6, 7), but may also subvert the innate immune response by inhibiting various signal transduction pathways and suppressing the activation of transcription factors such as NF-κB or STAT-1 (8–10). Other proinflammatory mediators induced by enteropathogenic bacteria may play a critical role in the pathophysiology of enteritis and related diseases. Among them, NO is a potent effector of the innate immune system, which plays a major role in the development of inflammation (11) and in the fight against pathogens (12). Under pathophysiologic conditions, NO is synthesized in large amounts by the inducible NO synthase (iNOS). The transcription of the gene encoding iNOS can be induced by bacteria (12, 13) or by proinflammatory cytokines (13) and requires the activation of diverse transcription factors including NF-κB or STAT-1 (14). We recently established that chemical and cellular sources of NO suppress the EHEC production of Shiga-toxin (Stx), the main virulence factor responsible for hemorrhagic symptoms, without affecting the growth and the survival of the bacteria (15). However, in the context of EHEC/NO interaction study, the effect of these bacteria on iNOS induction has not yet been investigated.

The aim of this study was to determine whether EHEC modulate iNOS expression and activity in human epithelial cell lines, stimulated or not by proinflammatory cytokines. We found that EHEC suppress the STAT-1-dependent transcription of the gene encoding iNOS in activated cells. This inhibition requires the activation of the enzyme heme oxygenase (HO)-1 by EHEC.

*Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Microbiologie UR454, Saint-Genès-Champanelle; †Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 747, Laboratoire de Pharmacologie, Toxicologie et Signalisation Moléculaire, Université Paris Descartes, Paris; and ‡Pathogénie Bactérienne Intestinale, USC Institut National de la Recherche Agronomique 2018, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France

Received for publication October 11, 2007. Accepted for publication February 12, 2008.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[1] This work was supported by grants from Institut National de la Recherche Agronomique and Région Auvergne (to M.V.), from Université Paris Descartes, Arthritis Fondation Courtin, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (to F.R.), and from Société Française de Rhumatologie (to N.T.).

[2] F.R. and N.T. contributed equally to this work.

[3] Address correspondence and reprint requests to Dr. Alain P. Gobert, Unité de Microbiologie, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France. E-mail address: agobert@clermont.inra.fr

[4] Abbreviations used in this paper: EHEC, enterohemorrhagic *Escherichia coli*; LEE, locus of enterocyte effacement; iNOS, inducible NO synthase; Stx, Shiga-toxin; HO, heme oxygenase; Bay 11–7082, (E)3-[(4-methylphenyl)sulfonyl]-2-propenenitrile; ZnPP, zinc protoporphyrin IX; CO, carbon monoxide; CORM-2, tricarbonyldichlororuthenium-(II)-dimer; siRNA, small interfering RNA; EPEC, enteropathogenic *E. coli*.

Copyright © 2008 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/08/$2.00

Table I. *List of bacteria*

Strain	Origin[a]	Serotype	LEE	*stx1/stx2*	Source
EDL933	HC/O	O157:H7	+	+/+	ATCC # 700927
Sakaï	HUS/O	O157:H7	+	+/+	STEC Center[b]
8624	HC/O	O157:H7	+	−/+	STEC Center[b]
CL3	HUS	O113:H21	−	−/+	STEC Center[b]
CL15	HUS	O113:H21	−	−/+	STEC Center[b]
87307	HUS	O113:H21	−	−/+	STEC Center[b]
EDL933 Δ*eae*	NA	O157:H7	+	+/+	Ref. 19
EDL933 Δ*espA*	NA	O157:H7	+	+/+	Ref. 16
EDL933 Δ*espD*	NA	O157:H7	+	+/+	Ref. 17
EDL933 Δ*sepL*	NA	O157:H7	+	+/+	Ref. 18
EDL933 Δ*stx1/stx2*	NA	O157:H7	+	−/−	Ref. 10
DH5α	ND	ND	−	−/−	Stratagene
EcG1	F	ND	−	−/−	This work
EcG2	F	ND	−	−/−	This work

[a] HC, hemorrhagic colitis; HUS, hemolytic-uremic syndrome; O, outbreak; NA, not applicable; ND, not determined; F, healthy human feces.

[b] National Food Safety and Toxicology Center, Michigan State University, East Lansing, MI; STEC center: http://shigatox.net.

Materials and Methods

Pharmacological reagents

The NF-κB inhibitors, namely *Z*-Leu-Leu-Leu-CHO (20 μM) and (*E*)3-[(4-methylphenyl)sulfonyl]-2-propenenitrile (Bay 11–7082; 20 μM), and the JAK-2 inhibitor 1,2,3,4,5,6-hexabromocyclohexane (20 μM) were purchased from Calbiochem. The STAT-1 inhibitor (2-fluoroadenine-9-b-D-arabinofuranoside also named fludarabine; 20 μM), the HO-1 inhibitor zinc protoporphyrin IX (ZnPP; 10 μM), bilirubin, and the carbon monoxide (CO) donor tricarbonyldichlororuthenium-(II)-dimer (CORM-2) were obtained from Sigma-Aldrich.

Bacteria

Bacteria used throughout this study are listed in Table I. Six O157:H7 and O113:H21 EHEC strains were isolated from patients with hemorrhagic colitis or hemolytic and uremic syndrome; these strains were selected because they express the major virulence factors usually carried by the majority of the bacteria belonging to both serotypes. The *eae*, *espA*, *espD*, *sepL*, and *stx1/stx2* isogenic mutants in the strain EDL933 were used and have been previously described (10, 16–19). Commensal *E. coli* (isolates EcG1 and EcG2) were obtained as follows: Feces from healthy human were 10^4-fold-diluted and plated overnight at 37°C on sorbitol MacConkey agar plates; purity of isolated colonies was monitored by direct microscopic observation after Gram staining, and phylum was determined by API gallery and 16S rRNA gene sequencing as previously described (20). We determined by PCR that the strains EcG1 and EcG2 do not possess the genes *stx2*, *espA*, and *eae* (data not shown).

Bacteria were isolated on Luria-Bertani agar plates. One clone was grown overnight at 37°C in Luria-Bertani broth then diluted and grown in cell culture medium for 2 h to the exponential growth phase ($A_{600} \sim 0.2$–0.4). These bacteria were used to infect epithelial cells.

Cultures of epithelial cells and infections

The human colonic epithelial cell lines Hct-8 and Caco-2 were maintained in DMEM, 10% FBS, 1% sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin. T84 cells were cultured in supplemented DMEM/Ham's F12 (1/1). Cells (10^6/ml) were cultured for 7–10 days at 37°C under 5% CO_2. Confluent cells were stimulated with 50 ng/ml IFN-γ, 20 ng/ml TNF-α, and/or 5 ng/ml IL-1β (each obtained from Pierce), in the presence or absence of CORM-2, bilirubin, or bacteria at a multiplicity of infection of 1–100 in complete medium without antibiotics; cytokines and bacteria were added at the same time. Pharmacological inhibitors were added to cell 30 min before infection. Following infection, cocultures were washed and 1) RNA or proteins were extracted from fixed cells, or 2) a fresh complete medium containing 2 mM l-arginine, 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, and 50 μg/ml gentamicin was added to determine NO production after 24 h.

Transfection and HO-1 silencing

Cells cultured in 6-well plates were transfected overnight with 200 nM small interfering RNA (siRNA) for human HO-1 (5′-AAGCCACACAG CACUAUGUAAdTdT-3′ and 5′-UUACAUAGUGCUGUGUGGCUU dTdT-3′; Ref. 21) or lamin as control (Dharmacon), using siLentFect Lipid Reagent (Bio-Rad). After 18 h, cells were washed and stimulated with cytokines and/or infected with EHEC.

mRNA analysis by real-time PCR

Total RNA of epithelial cells was isolated using TRIzol (Molecular Research Center) and was reverse-transcribed (2 μg) using oligo(dT) primers and 5 U/μl Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). PCR was conducted using 1 μl of cDNA, 0.25 U Platinum *Taq*DNA polymerase (Invitrogen), 0.12 pmol/μl each of 5′ and 3′ human iNOS (5′-ACCTCAG CAAGCAGCAGAAT-3′ and 5′-ATCTGGAGGGGTAGGCTTGT-3′, 269 bp) or *hmox-1* (the gene encoding HO-1) primers (5′-ACATCTAT GTGGCCCTGGAG-3′ and 5′-GGCAATCTTTTTGAGCACCT-3′, 287 bp), and 0.03 pmol/μl each of β-actin primers (436 bp; 10). One PCR cycle consisted of the following: 94°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 1.5 min; the total cycle number was 30. Real-time PCR was performed using the same primers and the SYBR Premix Ex *Taq* kit (Takara); reactions were conducted in the Mastercycler ep Realplex Silver apparatus (Eppendorf). One PCR cycle consisted of the following: 94°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 45 s. Results were calculated using the comparative cycle threshold method and are expressed as relative mRNA expression compared with uninfected cells.

EMSA

Nuclear proteins of cultured epithelial cells were purified using the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extract kit (Pierce) and protein concentration was measured with the Protein Assay kit (Bio-Rad). NF-κB and STAT-1 DNA-binding activities were analyzed as previously described (10) using 2 μg proteins. The double-stranded oligonucleotide probes (40 fmoles) containing the NF-κB (5′-TCCAA*GGGGACTTTCC*ATG-3′) and the STAT-1 (5′-GACAT*TTCCCGTAA*ATC-3′) binding consensus sequence (italicized letters) were used.

Immunolocalization of transcription factors

Immunocytochemistry and confocal microscopy were performed as previously described (10). The anti-NF-κB p65 rabbit polyclonal Ab (1/500; Calbiochem), the anti-STAT-1 rabbit polyclonal Ab (1/100; Epitomics), and the goat anti-rabbit IgG DyLight™ 647 conjugated (1/1000; Pierce) were used.

HO-1 Western blot analysis

Immunoblots were performed as previously described using a rabbit anti-human HO-1 Ab (StressGen; Ref. 21). Equal transfer of proteins was confirmed by staining the nitrocellulose membrane with Ponceau Red. Proteins from chondrocytes of Coprotoporphyrin-treated mice were used as positive control (21).

Determination of NO_x concentration

In culture supernatants, the concentrations of the stable oxidized products of NO, NO_3^- and NO_2^-, were determined using the Nitrite/Nitrate Assay kit (Sigma-Aldrich), followed by spectrophotometric measure of absorbency at 540 nm.

Statistical analysis

Quantitative data are presented as the mean ± SEM. Student's *t* test was used to determine significant differences between two groups. ANOVA with the Student-Newman-Keuls test was used to analyze significant differences among multiple groups; $p = 0.05$ was considered significant.

Results

EHEC inhibits cytokine-stimulated iNOS induction in human enterocytes

Hct-8 cells were infected with different strains of EHEC in the presence or absence of IFN-γ. The six EHEC strains tested, the commensal *E. coli* isolates, or *E. coli* DH5α were not able to induce iNOS mRNA expression in the epithelial cell lines after 6 h of coculture (Fig. 1*A*). We then sought to determine the effect of bacteria on activated cells. As shown in Fig. 1*B*, iNOS mRNA expression was increased in Hct-8 cells treated 6 h with IFN-γ. When IFN-γ and EHEC isolates belonging to O157:H7 or O113:H21 serotypes were added together with the cells, the levels of

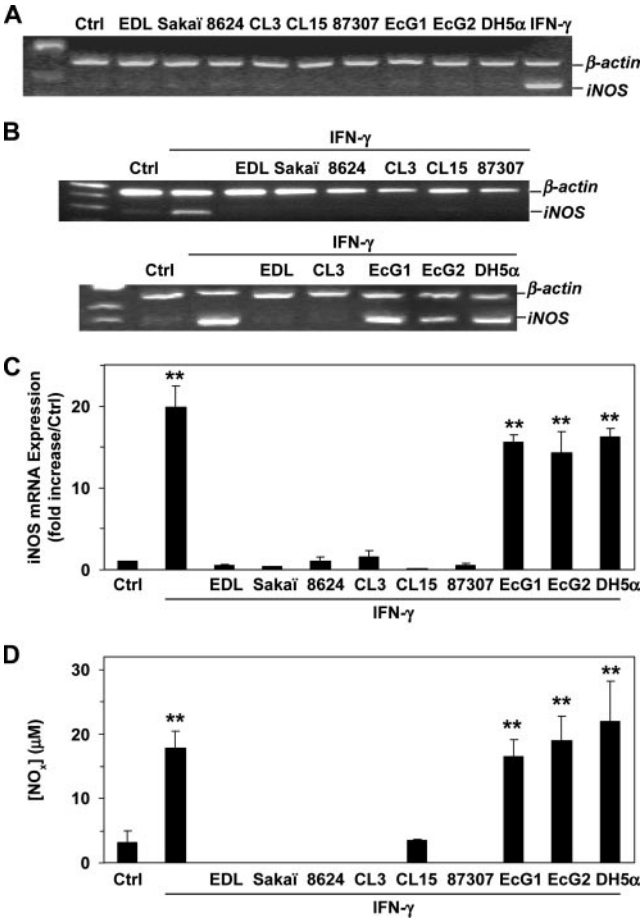


FIGURE 1. Effect of EHEC on iNOS induction in human enterocytes. Hct-8 cells were infected with bacteria for 6 h. RNA was purified, reverse transcribed, and the expression level of the gene encoding iNOS was analyzed by RT-PCR (*A*). Cells treated with IFN-γ were used as positive control for iNOS mRNA expression. Cells were treated with IFN-γ in the presence or absence of bacteria. Subsequently, iNOS gene transcription was analyzed by RT-PCR (*B*) and real-time PCR (*C*). The 6-h stimulated cells were washed and incubated for 18 h in complete medium containing antibiotics. $[NO_2^-]$ plus $[NO_3^-]$ were then measured in culture supernatants (*D*). For *C* and *D*, **, $p < 0.01$ vs control cells and cells treated with IFN-γ and infected with the EHEC strains ($n = 4$). Ctrl, Untreated cells; EDL, EDL933.

iNOS transcripts were dramatically decreased in comparison to cells treated with IFN-γ; the inhibitory effect was observed with a multiplicity of infection of 10 or 100, but not of 1 (data not shown). However, iNOS mRNA expression in activated epithelial cells was not inhibited by the commensal *E. coli* isolates or by the strain DH5α (Fig. 1*B*). These results were confirmed by real-time PCR (Fig. 1*C*). The expression of the iNOS gene was up-regulated by ~20-fold under IFN-γ stimulation when compared with control cells. This increase was significantly inhibited by 97–105% by the use of EHEC, according to the strain tested. Similarly, IFN-γ-induced NO synthesis in Hct-8 cells was completely inhibited using the six EHEC strains (Fig. 1*D*); NO generation was not inhibited by commensal *E. coli* isolates or by the strain DH5α (Fig. 1*D*).

Similar results were obtained with Caco-2 and T84 cells (Table II). Moreover, iNOS mRNA expression and NO production increased by ~20% when the cells were stimulated with a cytokine mix (IFN-γ, TNF-α, and IL-1β), in comparison to the cells that were only stimulated with IFN-γ; in this condition, the EHEC inhibitory effect was also observed.

Table II. *Induction of iNOS in human epithelial cell lines*[a]

	Ctrl	IFN-γ	IFN-γ + EDL933
Caco-2			
iNOS mRNA[b]	1	18.4 ± 1.9	0.5 ± 0.2
$[NO_x]$ (μM)	0.8 ± 0.3	20.2 ± 3.7	1.2 ± 0.7
T84			
iNOS mRNA[b]	1	17.3 ± 0.8	0.8 ± 0.2
$[NO_x]$ (μM)	0.6 ± 0.1	21.2 ± 0.6	1.1 ± 0.5

[a] Caco-2 or T84 cells were stimulated with IFN-γ, in the presence or absence of the strain EDL933, for 6 h. Subsequently, iNOS mRNA expression was analyzed by real-time PCR. Cells activated for 6 h were washed and incubated with fresh medium containing antibiotics for 18 h. NO concentrations were measured in the culture supernatants. Each data is the mean ± SEM of $n = 3$–4 independent experiments.

[b] Express as a fold increase/Ctrl.

Together these data demonstrate that O157:H7 and O113:H21 EHEC repress iNOS mRNA expression in human enterocytes activated by IFN-γ.

iNOS induction inhibition by EHEC is STAT-1-dependent

We next aimed to identify the molecular mechanism by which EHEC suppress IFN-γ-induced iNOS gene expression. We first demonstrated that iNOS mRNA expression (Fig. 2*A*) and NO production (Fig. 2*B*) in response to IFN-γ stimulation was completely

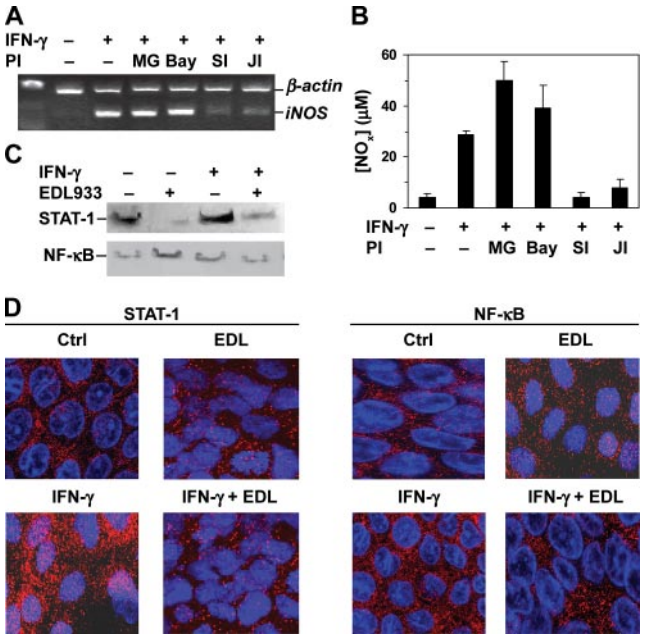


FIGURE 2. STAT-1 and NF-κB activation. *A* and *B*, Identification of the transcription factor implicated in iNOS induction. Hct-8 cells were treated for 30 min with pharmacological inhibitors (PI), namely the NF-κB inhibitors MG132 (MG) and Bay 11–7082 (Bay), the STAT-1 inhibitor (SI), or the JAK-2 inhibitor (JI); cells were then stimulated for 6 h with IFN-γ. The expression of the iNOS gene was analyzed by RT-PCR (*A*). Activated cells were incubated for 18 h in complete medium containing antibiotics and NO generation was measured in culture supernatants (*B*). *C*, Nuclear proteins from cells activated with IFN-γ ± EDL933 (EDL) for 3 h were extracted and analyzed by EMSA. Similar results were obtained in three independent experiments. *D*, Cellular localization of STAT-1 and NF-κB. Hct-8 cells were activated for 3 h and fixed on Lab-Tek slides. STAT-1 and NF-κB were immunodetected using an anti-p65 Ab (red) and with an anti-STAT-1 Ab (red), respectively. Nuclear outline was defined by DAPI staining (blue). Merged images are shown and overlay is presented in pink. The same results have been obtained in three independent experiments.

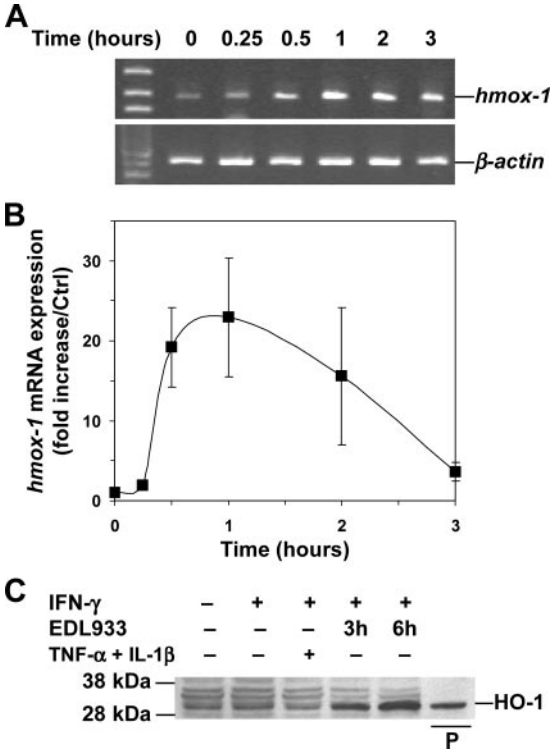


FIGURE 3. Induction of HO-1 by EHEC. *A* and *B*, Expression of *hmox-1* mRNA in response to EHEC. Hct-8 cells were infected with EDL933 in the presence or absence of IFN-γ and/or TNF-α and IL-1β. At indicated times, total RNA was extracted and the expression of *hmox-1* was analyzed by RT-PCR (*A*) and semiquantitative PCR (*B*; $n = 4$). *C*, The presence of HO-1 protein was monitored by Western blotting. Equal amounts of protein (25 μg) were loaded on the gel. P, Positive control.

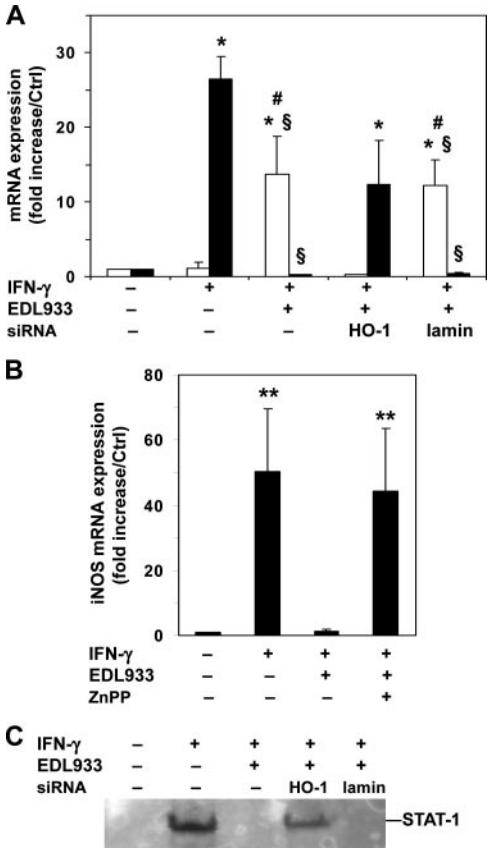


FIGURE 4. Inhibition of iNOS gene transcription by HO-1 in activated cells. *A*, *hmox-1* interference. Cells were transfected or not with HO-1 or lamin siRNA before a stimulation with IFN-γ, in the presence or absence of EDL933. Subsequently, the *hmox-1* (open bars) and *iNOS* (plain bars) mRNA expression levels were analyzed by real-time PCR after 2 and 6 h of infection, respectively. For both genes, *, $p < 0.05$ vs control cells; §, $p < 0.05$ vs cytokine-treated cells; #, $p < 0.05$ vs HO-1 siRNA-treated cells infected with EDL933 and stimulated with IFN-γ ($n = 4$). *B*, HO activity inhibition. Cells were treated with IFN-γ, EDL933, and/or ZnPP for 6 h. The level of iNOS mRNA was measured by real-time PCR. **, $p < 0.01$ vs control cells and EDL933-infected cells treated with IFN-γ ($n = 3$). *C*, Effect of HO-1 on STAT-1 activation. Nuclear proteins from cells transfected or not with HO-1 or lamin siRNA and activated for 3 h with IFN-γ and/or EDL933 were extracted and analyzed by EMSA. Similar results were obtained in two independent experiments.

inhibited using a STAT-1 or a JAK-2 inhibitor, but not by the NF-κB inhibitors Z-Leu-Leu-Leu-CHO and Bay 11–7082. Similar results were obtained when TNF-α and IL-1β were used to stimulate the cells together with IFN-γ (data not shown). Thus, these data suggest that iNOS transcription in activated epithelial cells involves the JAK-2/STAT-1 transduction pathway.

STAT-1 and NF-κB activation were then assessed by EMSA. As shown in Fig. 2*C*, we observed an increase in STAT-1 DNA-binding activity upon stimulation with IFN-γ in comparison to control cells. This enhancement was fully inhibited when EDL933 was added to the activated cells. Moreover, the basal STAT-1 activation observed in control cells was suppressed after infection with the bacteria. Oppositely, NF-κB DNA binding activity was not modulated by IFN-γ or by the strain EDL933.

These results were confirmed by immunofluorescence and confocal microscopy (Fig. 2*D*). The nuclear translocation of STAT-1 was evidenced in IFN-γ-treated Hct-8 cells, and was suppressed by the addition of the strain EDL933. NF-κB was detected only in the cytoplasm of control or IFN-γ-activated cells; its nuclear translocation was observed in ~10% of EDL933-infected cells, as previously described (10).

We conclude that the inhibition of STAT-1 activation by EHEC blocks the induction of iNOS gene transcription.

The implication of HO-1 in iNOS mRNA expression inhibition

HO-1 activity has been previously described to inhibit iNOS induction (21–25). We therefore hypothesized that EHEC suppress iNOS mRNA expression through the activation of HO-1. We first analyzed *hmox-1* mRNA expression levels in Hct-8 cells in response to EHEC by RT-PCR (Fig. 3*A*) and semiquantitative PCR (Fig. 3*B*). The gene *hmox-1* was up-regulated 0.5 h after the beginning of the infection, reached a peak after 1 h, and decreased from this level at 2 and 3 h. Compared with uninfected cells, the level of HO-1 protein in human enterocytes was enhanced in response to a 3-h EHEC infection (Fig. 3*C*). IFN-γ or cytokines did not induce HO-1 in Hct-8 cells (Fig. 3*C*). Additionally, *hmox-1* was not up-regulated when the cells were infected with EcG1, EcG2, or DH5α (data not shown).

To investigate the role of HO-1 in EHEC-mediated iNOS induction inhibition in human enterocytes, we first used a siRNA-based strategy. Cells were first exposed to HO-1 or lamin siRNA, and were then were stimulated by IFN-γ and/or infected with EDL933; HO-1 and iNOS mRNA expression were subsequently assessed by real-time PCR (Fig. 4*A*). The HO-1 mRNA was expressed upon EDL933 infection when compared with uninfected cells, but was not induced by IFN-γ. Inversely, iNOS mRNA expression was up-regulated in the presence of IFN-γ but was not

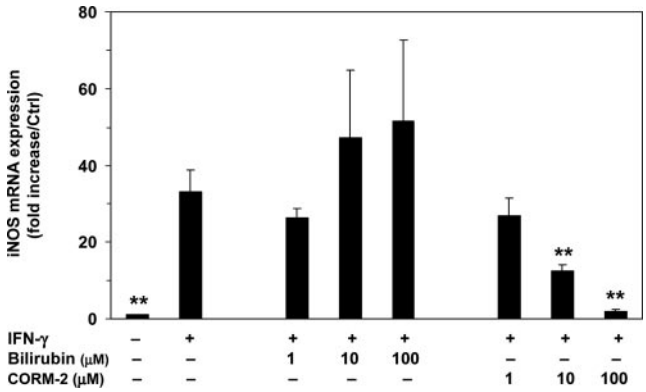


FIGURE 5. Hct-8 cells were stimulated for 6 h with IFN-γ in the presence or absence of various concentrations of bilirubin or CORM-2. Subsequently, iNOS gene transcription was analyzed by real-time PCR. **, $p < 0.01$ when compared with cells treated with IFN-γ ($n = 3$–4).

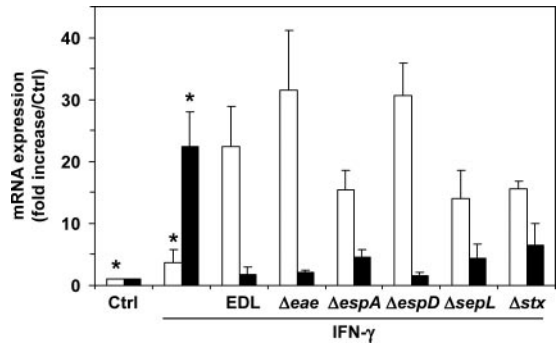


FIGURE 7. Effect of different mutant strains on *hmox-1* induction and iNOS transcription inhibition. Hct-8 cells were infected with EDL933 (EDL) or with isogenic mutants lacking *eae*, *espA*, *espD*, *sepL*, or *stx1/stx2* (*stx*) genes, in the presence of IFN-γ. The relative expression of *hmox-1* (open bars) and *iNOS* (plain bars) genes was measured by semiquantitative PCR after 2 and 6 h of infection, respectively. *, $p < 0.05$ vs the others conditions ($n = 3$–5).

stimulated by the bacteria. The expression of *hmox-1* in EDL933-infected cells was completely inhibited using HO-1 siRNA; this inhibition was concomitantly associated with the partial, but significant, restoration of iNOS mRNA expression. The lamin siRNA had no effect on *hmox-1* and iNOS mRNA expression in Hct-8 cells stimulated with IFN-γ and infected by EDL933. To further verify the association of HO-1 induction with the inhibition of iNOS mRNA expression, we used the HO inhibitor ZnPP in Hct-8 cells/EDL933 cocultures. In the presence of ZnPP, the EHEC-induced inhibition of iNOS mRNA expression was completely suppressed (Fig. 4*B*). Concomitantly, STAT-1 activation was partially restored using HO-1 siRNA, but not lamin siRNA, on cells activated by IFN-γ and infected with EDL933 (Fig. 4*C*).

To gain further insight into the mechanism by which HO-1 activity inhibits iNOS mRNA expression, we treated activated Hct-8 cells with the two main products of heme metabolism, namely bilirubin and CO. The IFN-γ-dependent iNOS gene expression was not modulated by various concentrations of bilirubin (Fig. 5). Inversely, a concentration-dependent inhibition of iNOS mRNA expression was observed using the CO donor CORM-2 (Fig. 5).

We next reasoned that EHEC-induced HO-1 activity may suppress iNOS mRNA expression in unstimulated epithelial cells. HO-1 expression was up-regulated by 11 ± 3.1-fold in EDL933-infected cells when compared with control cells; this increase was completely inhibited using HO-1 siRNA, but not lamin siRNA. However, iNOS mRNA expression was not induced in cells infected with EHEC in the presence or absence of HO-1 or lamin siRNA (Fig. 6).

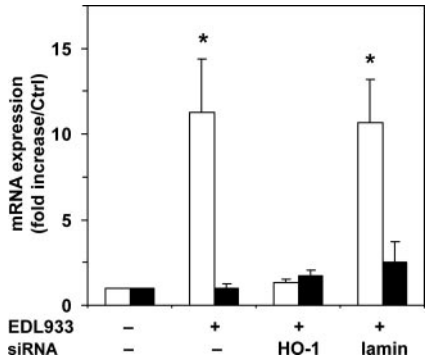


FIGURE 6. Cells were transfected or not with HO-1 or lamin siRNA before an infection with the strain EDL933. The expression of *hmox-1* (open bars) and *iNOS* (plain bars) genes were analyzed by real-time PCR after 2 and 6 h of infection, respectively. *, $p < 0.05$ vs control cells and infected cells treated with HO-1 siRNA ($n = 3$).

These results indicate that HO-1 activity is required for EHEC-mediated inhibition of STAT-1 activation and iNOS mRNA expression in IFN-γ-activated human enterocytes, but does not modulate iNOS transcription in untreated cells.

Toward the identification of the EHEC factor responsible for HO-1 induction

We analyzed the effect on *hmox-1* induction and on *iNOS* inhibition of the main bacterial factors implicated in the EHEC pathogenesis: intimin is encoded by the LEE gene *eae* and allows the intimate attachment of the bacteria to epithelial cells; EspA forms the needle of the type III secretion system; EspD protein is essential for the formation of surface appendages and is integrated in the cytoplasmic membranes of eukaryotic cells; SepL is involved in the translocation of bacterial factors; the main virulence factor is Stx encoded by the genes *stx1* and *stx2*. The gene *hmox-1* was up-regulated by 15–30-fold in Hct-8 cells cocultured with EDL933, *eae*-, *espA*-, *espD*-, *sepL*-, or *stx1*-/*stx2*- strains when compared with uninfected cells (Fig. 7). Concomitantly, there was no significant difference in the degree of down-regulation of iNOS mRNA in IFN-γ-treated Hct-8 cells between the wild-type strain and isogenic mutants (Fig. 7).

Discussion

Our results show that EHEC-induced HO-1 in human epithelial cells is a critical modulator of the innate immune response. Although HO-1 has been previously implicated in attenuating the inflammatory response (26, 27) and in the inhibition of iNOS gene expression (22–25), the present study is the first to demonstrate that a pathogenic bacterium suppresses NO production by inducing HO-1 in activated human colonic epithelial cells.

In our experimental conditions, activation of the transcription factor STAT-1 was required for induction of iNOS gene transcription in activated Hct-8 cells because a STAT-1 inhibitor or a JAK-2 inhibitor, but not NF-κB inhibitors, suppressed the IFN-γ-induced iNOS mRNA expression, as previously described with other cell types (14, 28). Similar to previous findings obtained with Hep-2 and T84 cells (9, 29), we found that EHEC interferes with STAT-1 activation in Hct-8 and Caco-2 cells activated with IFN-γ or with the three cytokines, without any effect on NF-κB. Nonetheless, we establish herein that EHEC inhibit the activation of STAT-1 by

inducing HO-1. The enzyme HO-1 catabolizes heme into CO, biliverdin that is rapidly converted to bilirubin, and iron (30). These products have antioxidant properties and may mediate the anti-inflammatory response of HO-1 (26, 31–33). It has been described (34) that the HO-1-dependent inhibition of the IFN-γ-STAT-1 signaling pathway in murine endothelial cells is dependent on the formation of bilirubin. Nonetheless, our experiments further indicate that bilirubin has no effect on iNOS gene expression in cytokine-treated Hct-8 cells; rather, iNOS mRNA expression was inhibited by the CO donor CORM-2. Therefore, we propose that CO is the key element of iNOS gene regulation, as recently established in Caco-2 cells (35). Aside from its role in heme degradation, HO-1 has a critical function in maintaining cellular homeostasis. HO-1-deficient mice do not normally survive and the animals that do survive die within a year while demonstrating signs of chronic inflammation in numerous organs (36). Thus, it is proposed that HO-1 serves as an adaptive mechanism to protect cells from oxidative stress (37). In this context, an increased expression of HO-1 has also been shown in pathophysiological states such as atherosclerosis (38), sepsis (39), *Helicobacter pylori*-positive and -negative gastritis, and ulcerative colitis (40); in these two last inflammatory diseases, HO-1 was immunodetected in superficial and cryptic epithelial cells. Additionally, the protective role of HO-1 has been demonstrated in experimental colitis in trinitrobenzene sulfonic acid and dextran sodium sulfate models (41, 42), and in IL-10-deficient mice (43). The preventive effect of HO-1 was correlated with decreased free radical production and the inhibition of iNOS expression in colonic tissues (41). Together with our findings, these reports suggest that HO-1 could be over-expressed in the human colonic epithelium during EHEC infection and may modulate the host inflammatory response and the development of the hemorrhagic symptoms.

When *hmox-1* expression was inhibited by siRNA, a partial restoration of STAT-1 activation and iNOS mRNA expression was observed. However, when HO-1 activity was inhibited by ZnPP, the transcription of the gene encoding iNOS was completely restored. According to this result, we hypothesize that the constitutive isoforms of HO, namely HO-2 and HO-3, could be implicated in part in iNOS gene down-regulation. Nonetheless, we might speculate EHEC suppress STAT-1 activation by others mechanisms than HO-1 induction or inhibit iNOS transcription by acting on different transcription factors. Intriguingly, O157:H7 EHEC express an HO encoded by the gene *chuS* (44). This gene is shared by other pathogenic bacteria such as *Corynebacterium diphtheriae* (45) or *Neisseria meningitides* (46), but is not present in nonpathogenic *E. coli* laboratory strains. It has been previously demonstrated that a bacterial enzyme, namely the arginase of *Helicobacter pylori*, can act as a potent regulator of iNOS activity in eukaryotic cells (12). Thus, we constructed a *chuS* mutant in the EDL933 background to determine the implication of bacterial HO on host iNOS mRNA expression. We did not find any differences in the levels of iNOS induction in cells infected with EDL933 or with the isogenic mutant *chuS*, in the presence or absence of cytokines (data not shown). These results demonstrate that EHEC HO does not modulate iNOS gene expression in human enterocytes.

High-output NO formation in pathological conditions may determine pathogen behavior and host susceptibility. Therefore, pathogenic bacteria have elaborated different strategies to modulate iNOS expression and NO production (12). The iNOS gene is up-regulated in human epithelial cells infected with enteroinvasive bacteria such as *E. coli* or *Salmonella dublin* (47, 48), or in IFN-γ-primed enterocytes infected with *S. dublin* (13). Conversely, we and others have observed that iNOS is not directly induced in colonic epithelial cells by EHEC (this work) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC; Ref. 49) that develop extracellularly. Furthermore, these bacteria inhibit the IFN-γ-induced iNOS mRNA expression (this work and Ref. 49). However, NF-κB activation is the main target for EPEC (49), whereas our data highlight that EHEC disrupt the STAT-1 signaling. We suggest that this discrepancy can be explained by the different technical approaches to stimulate iNOS mRNA expression (cytokine concentration, time of stimulation). Alternatively, EPEC and EHEC may have elaborated different strategies to disrupt cellular signalization and limit NO production. In this respect, it has been described that EHEC but not EPEC disrupt the IFN-γ-STAT-1 signaling in human epithelial cells (29). Moreover, the EPEC inhibitory effect on iNOS induction is linked to the LEE-encoded type three secretion system because a *sep-2* mutant strain that lacks a functional secretion machinery fails to repress the cytokine-induced NO production (49), whereas we show that 1) LEE positive and LEE negative EHEC strains are potent inhibitors of iNOS mRNA expression, and 2) LEE gene isogenic mutants exhibit the same inhibitory effect as the parental LEE-positive strain EDL933. Thus, we suggest that adhesion and the type III secretion system are not involved in inhibition of NO production. Moreover, our experimental data indicate that Stx is not involved in HO-1 induction and iNOS inhibition. The identification of the bacterial factor(s) responsible for *hmox-1* expression and NO production inhibition deserves additional investigation. Such research is currently underway in our laboratory.

The immune function of NO refers to its ability to modulate the inflammatory process and to kill pathogens. Moreover, we recently demonstrated that chemical or cellular sources of NO inhibit the expression of the gene *stx2* and the synthesis of Stx2, without affecting the growth and the survival of the bacteria (15). It should be noted that, in our previous report, we first stimulated the cells with cytokines for 18 h to induce iNOS, before adding EHEC (15); in the present study, Hct-8 cells were stimulated with cytokines and EHEC at the same time. Based on these both findings, it is tempting to speculate that EHEC suppress iNOS mRNA expression to decrease the NO-dependent Stx production inhibition. Therefore, limiting host NO production in human enterocytes may represent a strategy elaborated by EHEC to favor their own virulence.

Acknowledgments

We thank T. S. Whittam (Michigan State University, East Lansing, MI) and C. A. Guzman (Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany) for the gift of strains. Isolation and identification of human commensal *E. coli* isolates has been performed with the support of C. Del'Homme and E. Delmas (Institut National de la Recherche Agronomique, Saint-Genès-Champanelle, France). C. Besson and C. Leyrat are thanked for technical assistance. We are grateful to M. T. Corvol (Université Paris Descartes, Paris, France) for data analysis.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

1. Tarr, P. I., C. A. Gordon, and W. L. Chandler. 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 365: 1073–1086.
2. Murata, A., T. Shimazu, T. Yamamoto, N. Taenaka, K. Nagayama, T. Honda, H. Sugimoto, M. Monden, N. Matsuura, and S. Okada. 1998. Profiles of circulating inflammatory- and anti-inflammatory cytokines in patients with hemolytic uremic syndrome due to *E. coli* O157 infection. *Cytokine* 10: 544–548.
3. Proulx, F., J. P. Turgeon, C. Litalien, M. M. Mariscalco, P. Robitaille, and E. Seidman. 1998. Inflammatory mediators in *Escherichia coli* O157:H7 hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17: 899–904.
4. Litalien, C., F. Proulx, M. M. Mariscalco, P. Robitaille, J. P. Turgeon, E. Orrbine, P. C. Rowe, P. N. McLaine, and E. Seidman. 1999. Circulating inflammatory cytokine levels in hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 13: 840–845.

5. Westerholt, S., T. Hartung, M. Tollens, A. Gustrau, M. Oberhoffer, H. Karch, B. Klare, K. Pfeffer, P. Emmrich, and R. Oberhoffer. 2000. Inflammatory and immunological parameters in children with haemolytic uremic syndrome (HUS) and gastroenteritis-pathophysiological and diagnostic clues. *Cytokine* 12: 822–827.
6. Dahan, S., V. Busuttil, V. Imbert, J. F. Peyron, P. Rampal, and D. Czerucka. 2002. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection induces interleukin-8 production via activation of mitogen-activated protein kinases and the transcription factors NF-κB and AP-1 in T84 cells. *Infect. Immun.* 70: 2304–2310.
7. Dalmasso, G., A. Loubat, S. Dahan, G. Calle, P. Rampal, and D. Czerucka. 2006. *Saccharomyces boulardii* prevents TNF-α-induced apoptosis in EHEC-infected T84 cells. *Res. Microbiol.* 157: 456–465.
8. Hauf, N., and T. Chakraborty. 2003. Suppression of NF-κB activation and proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Immunol.* 170: 2074–2082.
9. Jandu, N., P. J. Ceponis, S. Kato, J. D. Riff, D. M. McKay, and P. M. Sherman. 2006. Conditioned medium from enterohemorrhagic *Escherichia coli*-infected T84 cells inhibits signal transducer and activator of transcription 1 activation by γ interferon. *Infect. Immun.* 74: 1809–1818.
10. Gobert, A. P., M. Vareille, A. L. Glasser, T. Hindre, T. de Sablet, and C. Martin. 2007. Shiga toxin produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* inhibits PI3K/NF-κB signaling pathway in globotriaosylceramide-3-negative human intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 178: 8168–8174.
11. Gobert, A. P., Y. Cheng, M. Akhtar, B. D. Mersey, D. R. Blumberg, R. K. Cross, R. Chaturvedi, C. B. Drachenberg, J. L. Boucher, A. Hacker, et al. 2004. Protective role of arginase in a mouse model of colitis. *J. Immunol.* 173: 2109–2117.
12. Gobert, A. P., D. J. McGee, M. Akhtar, G. L. Mendz, J. C. Newton, Y. Cheng, H. L. Mobley, and K. T. Wilson. 2001. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13844–13849.
13. Salzman, A. L., T. Eaves-Pyles, S. C. Linn, A. G. Denenberg, and C. Szabo. 1998. Bacterial induction of inducible nitric oxide synthase in cultured human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 114: 93–102.
14. Ganster, R. W., B. S. Taylor, L. Shao, and D. A. Geller. 2001. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-κB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8638–8643.
15. Vareille, M., T. de Sablet, T. Hindre, C. Martin, and A. P. Gobert. 2007. Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 10199–10204.
16. Beltrametti, F., A. U. Kresse, and C. A. Guzman. 1999. Transcriptional regulation of the *esp* genes of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181: 3409–3418.
17. Kresse, A. U., M. Rohde, and C. A. Guzman. 1999. The EspD protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells. *Infect. Immun.* 67: 4834–4842.
18. Kresse, A. U., F. Beltrametti, A. Muller, F. Ebel, and C. A. Guzman. 2000. Characterization of SepL of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182: 6490–6498.
19. Gobert, A. P., A. Coste, C. A. Guzman, T. Hindré, T. de Sablet, J. P. Girardeau, and C. Martin. 2008. Modulation of chemokine gene expression by Shiga-toxin producing *Escherichia coli* belonging to various origins and serotypes. *Microbes Infect.* 10: 159–165.
20. Robert, C., C. Chassard, P. A. Lawson, and A. Bernalier-Donadille. 2007. *Bacteroides cellulosilyticus* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the human gut microbial community. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1516–1520.
21. Benallaoua, M., M. Francois, F. Batteux, N. Thelier, J. Y. Shyy, C. Fitting, L. Tsagris, J. Boczkowski, J. F. Savouret, M. T. Corvol, et al. 2007. Pharmacologic induction of heme oxygenase 1 reduces acute inflammatory arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 56: 2585–2594.
22. Cavicchi, M., L. Gibbs, and B. J. Whittle. 2000. Inhibition of inducible nitric oxide synthase in the human intestinal epithelial cell line, DLD-1, by the inducers of heme oxygenase 1, bismuth salts, heme, and nitric oxide donors. *Gut* 47: 771–778.
23. Chen, M., W. Bao, R. Aizman, P. Huang, O. Aspevall, L. E. Gustafsson, S. Ceccatelli, and G. Celsi. 2004. Activation of extracellular signal-regulated kinase mediates apoptosis induced by uropathogenic *Escherichia coli* toxins via nitric oxide synthase: protective role of heme oxygenase-1. *J. Infect. Dis.* 190: 127–135.
24. Chen, J. C., F. M. Ho, P.-D. Lee Chao, C. P. Chen, K. C. Jeng, H. B. Hsu, S. T. Lee, W. W. Tung, and W. W. Lin. 2005. Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of I-κB kinase, nuclear factor-κB and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. *Eur. J. Pharmacol.* 521: 9–20.
25. Oh, G. S., H. O. Pae, B. S. Lee, B. N. Kim, J. M. Kim, H. R. Kim, S. B. Jeon, W. K. Jeon, H. J. Chae, and H. T. Chung. 2006. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-κB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Radic. Biol. Med.* 41: 106–119.
26. Lee, T. S., and L. Y. Chau. 2002. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat. Med.* 8: 240–246.
27. Nakahira, K., H. P. Kim, X. H. Geng, A. Nakao, X. Wang, N. Murase, P. F. Drain, X. Wang, M. Sasidhar, E. G. Nabel, et al. 2006. Carbon monoxide differentially inhibits TLR signaling pathways by regulating ROS-induced trafficking of TLRs to lipid rafts. *J. Exp. Med.* 203: 2377–2389.
28. Kleinert, H., T. Wallerath, G. Fritz, I. Ihrig-Biedert, F. Rodriguez-Pascual, D. A. Geller, and U. Forstermann. 1998. Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-κB-signaling pathways. *Br. J. Pharmacol.* 125: 193–201.
29. Ceponis, P. J., D. M. McKay, J. C. Ching, P. Pereira, and P. M. Sherman. 2003. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 disrupts Stat1-mediated γ interferon signal transduction in epithelial cells. *Infect. Immun.* 71: 1396–1404.
30. Ryter, S. W., J. Alam, and A. M. Choi. 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol. Rev.* 86: 583–650.
31. Otterbein, L. E., F. H. Bach, J. Alam, M. Soares, H. Tao Lu, M. Wysk, R. J. Davis, R. A. Flavell, and A. M. Choi. 2000. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat. Med.* 6: 422–428.
32. Sarady-Andrews, J. K., F. Liu, D. Gallo, A. Nakao, M. Overhaus, R. Ollinger, A. M. Choi, and L. E. Otterbein. 2005. Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Am. J. Physiol.* 289: L1131–L1137.
33. Overhaus, M., B. A. Moore, J. E. Barbato, F. F. Behrendt, J. G. Doering, and A. J. Bauer. 2006. Biliverdin protects against polymicrobial sepsis by modulating inflammatory mediators. *Am. J. Physiol.* 290: G695–G703.
34. Wu, J., J. Ma, S. T. Fan, H. J. Schlitt, and T. Y. Tsui. 2005. Bilirubin derived from heme degradation suppresses MHC class II expression in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338: 890–896.
35. Megias, J., J. Busserolles, and M. J. Alcaraz. 2007. The carbon monoxide-releasing molecule CORM-2 inhibits the inflammatory response induced by cytokines in Caco-2 cells. *Br. J. Pharmacol.* 150: 977–986.
36. Poss, K. D., and S. Tonegawa. 1997. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10919–10924.
37. Poss, K. D., and S. Tonegawa. 1997. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10925–10930.
38. Wang, L. J., T. S. Lee, F. Y. Lee, R. C. Pai, and L. Y. Chau. 1998. Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *Am. J. Pathol.* 152: 711–720.
39. Yet, S. F., A. Pellacani, C. Patterson, L. Tan, S. C. Folta, L. Foster, W. S. Lee, C. M. Hsieh, and M. A. Perrella. 1997. Induction of heme oxygenase-1 expression in vascular smooth muscle cells. A link to endotoxic shock. *J. Biol. Chem.* 272: 4295–4301.
40. Barton, S. G., D. S. Rampton, V. R. Winrow, P. Domizio, and R. M. Feakins. 2003. Expression of heat shock protein 32 (hemoxygenase-1) in the normal and inflamed human stomach and colon: an immunohistochemical study. *Cell Stress Chaperones* 8: 329–334.
41. Wang, W. P., X. Guo, M. W. Koo, B. C. Wong, S. K. Lam, Y. N. Ye, and C. H. Cho. 2001. Protective role of heme oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Am. J. Physiol.* 281: G586–G594.
42. Paul, G., F. Bataille, F. Obermeier, J. Bock, F. Klebl, U. Strauch, D. Lochbaum, P. Rummele, S. Farkas, J. Scholmerich, et al. 2005. Analysis of intestinal haemoxygenase-1 (HO-1) in clinical and experimental colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 140: 547–555.
43. Hegazi, R. A., K. N. Rao, A. Mayle, A. R. Sepulveda, L. E. Otterbein, and S. E. Plevy. 2005. Carbon monoxide ameliorates chronic murine colitis through a heme oxygenase 1-dependent pathway. *J. Exp. Med.* 202: 1703–1713.
44. Suits, M. D., G. P. Pal, K. Nakatsu, A. Matte, M. Cygler, and Z. Jia. 2005. Identification of an *Escherichia coli* O157:H7 heme oxygenase with tandem functional repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 16955–16960.
45. Schmitt, M. P. 1997. Utilization of host iron sources by *Corynebacterium diphtheriae*: identification of a gene whose product is homologous to eukaryotic heme oxygenases and is required for acquisition of iron from heme and hemoglobin. *J. Bacteriol.* 179: 838–845.
46. Zhu, W., A. Wilks, and I. Stojiljkovic. 2000. Degradation of heme in gram-negative bacteria: the product of the *hemO* gene of *Neisseriae* is a heme oxygenase. *J. Bacteriol.* 182: 6783–6790.
47. Witthoft, T., L. Eckmann, J. M. Kim, and M. F. Kagnoff. 1998. Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 275: G564–G571.
48. Resta-Lenert, S., and K. E. Barrett. 2002. Enteroinvasive bacteria alter barrier and transport properties of human intestinal epithelium: role of iNOS and COX-2. *Gastroenterology* 122: 1070–1087.
49. Maresca, M., D. Miller, S. Quitard, P. Dean, and B. Kenny. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector-mediated suppression of antimicrobial nitric oxide production in a small intestinal epithelial model system. *Cell. Microbiol.* 7: 1749–1762.

CHAPITRE 4

MODULATION DE LA RÉPONSE IMMUNE MUCOSALE DANS UN MODÈLE RAT D'INFECTION PAR LES EHEC

INTRODUCTION

Il est classiquement admis que les EHEC induisent une réponse immune innée mucosale en interagissant avec les cellules épithéliales intestinales ou les cellules immunitaires (te Loo D et coll., 2000). Cette réponse non-spécifique serait à l'origine de l'inflammation intestinale des dommages à l'épithélium et au développement du SHU (Fitzpatrick MM et coll., 1992). Cette théorie repose principalement sur deux observations : *i*) les EHEC stimulent *in vitro* la production de cytokines pro-inflammatoires ou de chimiokines, le plus souvent de façon dépendante de NF-κB et *ii*) des études cliniques ont montré une augmentation de cytokines pro-inflammatoires chez des enfants souffrant de SHU en comparaison d'enfants présentant uniquement une colite d'origine bactérienne ou virale (Gobert AP et coll., 2005). Néanmoins, une prédisposition génétique de certains individus à produire plus de cytokines pro-inflammatoires pourrait expliquer que la majorité des patients infectés par des EHEC ne développent pas un SHU (Westerholt S et coll., 2000). De plus, il a été démontré que les EHEC peuvent inhiber la réponse immune innée des cellules épithéliales intestinales (Ceponis PJ et coll., 2003; Hauf N and Chakraborty T, 2003; Gobert AP et coll., 2007) ; nous avons ainsi décrit dans le chapitre précédent que les EHEC induisent l'HO-1 qui supprime la transcription du gène codant pour la iNOS et donc la production de NO dans les cellules épithéliales activées.

L'utilisation de modèles animaux d'infection par les EHEC a permis d'analyser les mécanismes physiopathologiques conduisant au développement du SHU. Deux grands types de modèles sont proposés. D'une part, un modèle de SHU est obtenu en injectant la Stx chez des animaux. On observe alors des dommages rénaux caractérisés par une infiltration des leucocytes dans les glomérules, le détachement des cellules endothéliales et une accumulation des plaquettes conduisant à une thrombose. Ces modèles ont permis de rechercher l'implication des cytokines et des leucocytes dans la genèse du SHU (Keepers TR et coll., 2006; Sasaki S et coll., 2002), d'analyser les différences de toxicité entre Stx1 et Stx2 (Tesh VL et coll., 1993) ou d'étudier le rôle protecteur d'Ac anti-Stx ou de composés pharmacologiques (Ohara T et coll., 2002). D'autre part, des animaux peuvent être infectés directement avec les EHEC et présentent alors des pathologies glomérulaires (Eaton KA et coll., 2008). Il est cependant important de noter que les EHEC sont incapables de coloniser le côlon d'animaux conventionnels notamment du fait de la présence du microbiote intestinal ;

les animaux doivent donc être préalablement traités par la streptomycine pour éliminer une grande partie des bactéries Gram négatif composant le microbiote intestinal (Asahara T et coll., 2004), puis infectés par des souches résistantes à l'antibiotique. Ces modèles sont principalement utilisés pour l'étude de cibles thérapeutiques (Ac anti-Stx ; Yamagami S et coll., 2001), pour l'analyse des modifications histopathologiques (Taguchi H et coll., 2002) et pour des études de colonisation (Fujii J et coll., 1994). En revanche, la réponse immune/inflammatoire mucosale intestinale lors de l'infection par les EHEC n'a jamais été étudiée.

Nous avons donc développé un modèle d'infection par les EHEC chez des rats axéniques. Ce modèle nous a permis d'étudier l'expression de facteurs pro- et anti-inflammatoires dans la muqueuse colique en réponse aux EHEC et à des *E. coli* commensaux en s'affranchissant de l'effet barrière du microbiote intestinal.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. EXPÉRIMENTATIONS ANIMALES

Des rats axéniques mâles et femelles Fisher 344/CRL sont élevés dans notre animalerie en isolateur stérile. Tous les animaux ont reçu une alimentation stérile et de l'eau stérile *ad libitum* pendant toute la durée de l'expérience. Les rats âgés de cinq à sept semaines ont été infectés par gavage (10^9 bactéries en phase exponentielle de croissance/rat) par la souche d'EHEC O157:H7 EDL933 (cf. chapitre 1) ou par la souche d'*E. coli* commensale EcG2 (cf. chapitre 3). Les animaux ont été ensuite conservés en confinement L2.

Un prélèvement de fèces a été effectué sur chaque animal à différents temps pour déterminer l'implantation des bactéries. À la fin de l'expérience, les animaux ont été sacrifiés sous CO_2. Le côlon et le contenu caecal ont été récupérés sur chaque rat. Le côlon a été divisé en cinq parties pour étudier la colonisation et les dommages histologiques, extraire les ARN et les protéines, et analyser les différentes populations de cellules immunitaires par cytométrie de flux. Le contenu caecal a été utilisé pour déterminer la colonisation et la concentration en Stx2.

Le protocole utilisé lors de cette étude a été validé par le comité régional d'éthique en matière d'expérimentation animale (CE13-08).

II. DÉTERMINATION DE LA COLONISATION

Chaque prélèvement (fèces, côlon ou contenu caecal) a été pesé, broyé et repris dans 1 ml de PBS stérile. Une série de dilutions a été réalisée et étalée sur boites Mac Conkey + lactose pour la souche EcG2 et Mac Conkey + sorbitol pour la souche EDL933. Les bactéries blanches ont été dénombrées. Aucune colonie rose n'a été détectée.

III. ANALYSE DES ARNm

Les échantillons de côlon ont été broyés dans de l'azote liquide puis repris dans 1 ml de TRIzol. L'extraction des ARN et la rétro-transcription en ADNc ont été réalisées selon les conditions précisées dans le chapitre 3.

Tableau 1: Liste des amorces

Amorces	Séquences (5'-3')
TNFα-F	GCCGATTTGCCATTTCATAC
TNFα-R	TGGAAGACTCCTCCCAGGTA
iNOS-R	CAGCACGTGAGGATCAAAAA
iNOS-F	GCTTGTCTCTGGGTCCTCTG
IFNγ-F	CGAATCGCACCTGATCACTA
IFNγ-F	GACTCCTTTTCCGCTTCCTT
IL-1β-F	GCATCCAGCTTCAAATCTCA
IL-1β-R	ATCATCCCACGAGTCACAGA
IL-6-F	CCGGAGAGGAGACTTCACAG
IL-6-R	CAGAATTGCCATTGCACAAC
TGF-β1-F	TGAGTGGCTGTCTTTTGACG
TGF-β1-R	TGGGACTGATCCCATTGATT
hmox-1-F	GAAGAAGATTGCGCAGAAGG
hmox-1-R	GAAGGCGGTCTTAGCCTCTT
foxP3-F	CGGGAGAGTTTCTCAAGCAC
foxP3-R	CACAGGTGGAGCTTTTGTCA
IL-4-F	GTGATGTACCTCCGTGCTTG
IL-4-R	AGTGTTGTGAGCGTGGACTC
IL-10-F	TGGAGTGAAGACCAGCAAAG
IL-10-R	GGCAACCCAAGTAACCCTTA
β-actine-F	CCAGAGCAAGAGAGGTATCC
β-actine-R	CTGTGGTGGTGAAGCTGTAG

L'analyse semi-quantitative de l'expression des gènes codant pour le TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-4, IL-10, TGF-β1, Foxp3, iNOS et HO-1 a été réalisée par PCR en temps réel. Le gène codant pour la β-actine a été utilisé comme gène de ménage de référence. Les PCR en temps réel ont été effectuées sur les ADNc (2 µl) avec 0,5 µM des différentes amorces (Tableau 1) et le kit SYBR Premix Ex *Taq* kit (Lonza) dans l'appareil Mastercycler ep Realplex Silver (Eppendorf). Les niveaux d'expression des ARNm des gènes cibles ont été normalisés par rapport au contrôle interne *β-actine* et par rapport au niveau d'expression dans le côlon des rats axéniques en utilisant la méthode comparative du seuil de fluorescence. Les résultats sont alors présentés en tant qu'expression relative du gène cible/rats axéniques.

IV. ANALYSE PROTÉIQUE

Les tissus coliques ont été broyés dans de l'azote liquide et repris dans 750 µl de tampon de lyse (50 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM PMSF). La concentration en protéines a été déterminée grâce au kit Protein Assay (Bio-Rad).

Les Western-blot ont été réalisés par François Rannou et Natacha Thélier (laboratoire de Pharmacologie, Toxicologie et Signalisation Moléculaire, Université Paris Descartes, Paris) selon le protocole détaillé dans le chapitre 3.

V. DOSAGE DE Stx2

La concentration en Stx2 a été déterminée dans les contenus caecaux selon le protocole détaillé dans le chapitre 1.

VI. CYTOMÉTRIE DE FLUX

Le côlon congelé dans l'azote liquide a été digéré pendant 20 min dans 1 mg/ml de dispase (Roche), 0.25 mg/ml de collagénase A et 25 U/ml de DNAse (Boehringer Mannheim) à 37°C. La suspension a été passée à travers un filtre 70 µm puis centrifugée et lavée en PBS-SVF 4%. Les cellules ont été incubée pendant 1 h avec des Ac monoclonaux suivants dilués au 1/100 : anti-CD11c conjugué avec de l'APC-cyanine 7, anti-Gr-1 conjugué avec de l'isothiocyanate de fluorescéine, anti-CD3 conjugué avec la phycoérithrine, anti-CD4 conjugué avec la phycoérithrine-cyanine 5.5 et anti-CD19 conjugué avec l'allophycocyanine.

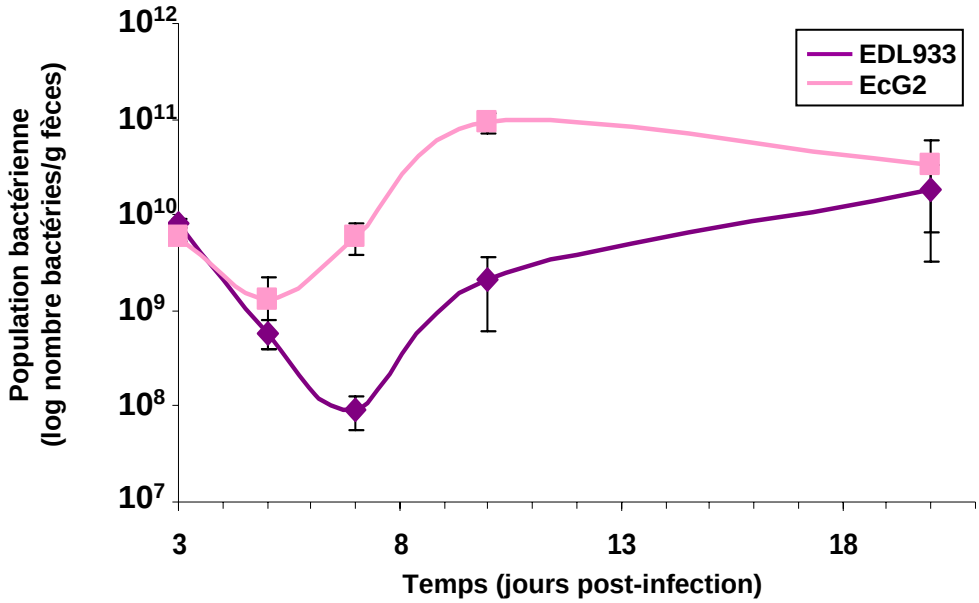
Les cellules ont été lavées en PBS-SVF 0,1% et reprises dans 300 µl. L'acquisition a été effectuée dans le cytomètre de flux of FACS buffer and acquired on LSR II (BD Biosciences) et les paramètres ont été analysés avec le logiciel FLOW Jo 8.3.

Cette analyse a été effectuée par Rupesh Chaturvedi (Département de gastroentérologie, Université de Vanderbilt, Nashville, USA).

VII. STATISTIQUES

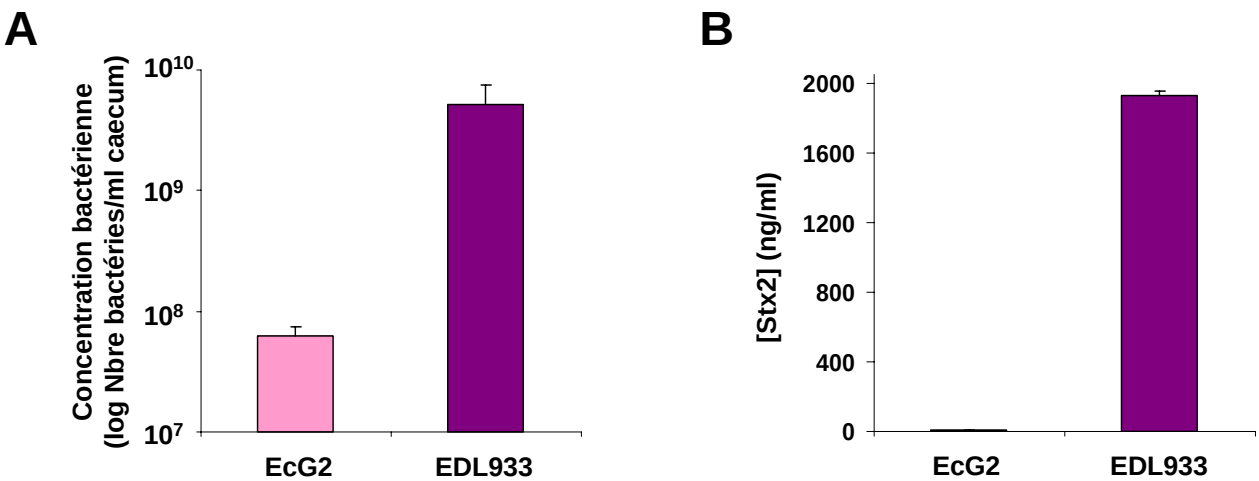
Les données obtenues sont présentées en tant que moyenne ± erreur standard à la moyenne. L'analyse statistique a été réalisée par un test *t* de Student quand seulement 2 groupes ont été comparés ; les échantillons ont été considérés comme non appariés. Une analyse de variance avec le test de Student-Newman-Keuls a été utilisée pour analyser les différences statistiques lorsque plus de 2 groupes ont été comparés.

Figure 1: Implantation des souches bactériennes chez les rats axéniques



Après infection des rats par la souche EDL933 ou par la souche *E. coli* commensale EcG2, les bactéries ont été dénombrées dans les fèces aux temps indiqués; n = 5 pour chaque groupe.

Figure 2: Présence des bactéries et production de Stx2 dans les cæca



Le nombre de bactéries (A) et la concentration en Stx2 (B) ont été mesurés dans le contenu caecal des rats infectés par EDL933 ou par EcG2 pendant 10 jours; n = 5.

RÉSULTATS

I. PARAMÈTRES CLINIQUES

Pendant toute la durée de l'expérience, la survie, le poids et l'apparition de diarrhées sanglantes ont été suivis dans l'ensemble des groupes de rats.

Le taux de survie à été de 100% dans l'ensemble des groupes au 20ème jour post-infection. Aucune perte de poids n'a été observée pour les différents groupes (résultats non montrés). De plus, les animaux infectés par la souche EDL933 n'ont pas développé d'hémorragie rectale et n'ont pas montré de signe de douleur.

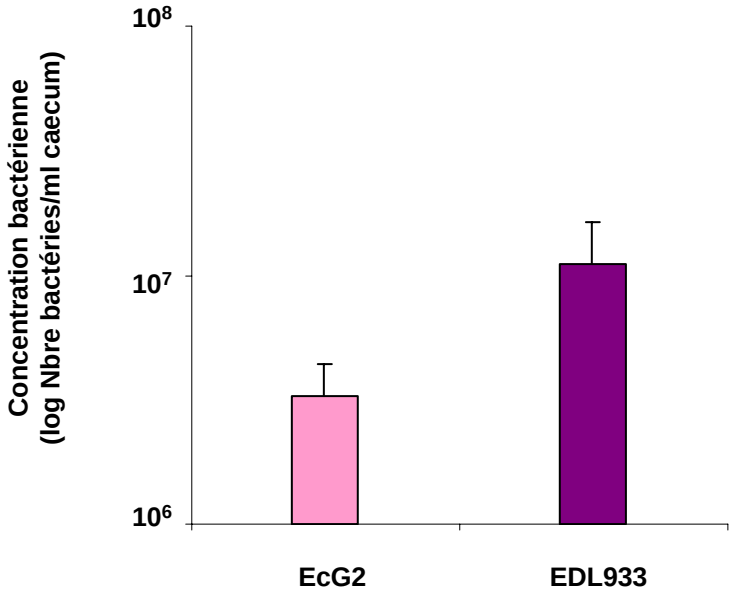
II. SUIVI DE L'IMPLANTATION DES SOUCHES BACTÉRIENNES

L'implantation des souches EDL933 et EcG2 dans le côlon des animaux a été suivie par dénombrement de ces bactéries sur milieux spécifiques dans les fèces des rats 3, 5, 7, 10 et 20 jours après inoculation. Le niveau de population des deux souches bactériennes atteint en moyenne ~ 10^{10} bactéries par g de fèces dès le 3ème jour après inoculation. Ces niveaux se maintiennent jusqu'au 20ème jour après inoculation chez tous les animaux (Fig. 1).

Le cæcum est la première partie du côlon ; chez les rongeurs, le cæcum est de taille relativement importante et rempli de bactéries facilitant la digestion. Les niveaux de population de la souche EDL933 et EcG2 dans le cæcum atteignent respectivement 10^9 et 10^6 bactéries par ml après les 10 jours suivant l'inoculation (Fig. 2A). Par ailleurs, une concentration de Stx2 d'environ 2000 ng/ml a été mesurée dans les cæca des rats infectés avec la souche EDL933 (Fig. 2B). Stx2 n'a pas été détectée dans ceux de rats infectés avec la souche EcG2 (Fig. 2B). Ce résultat démontre que les EHEC produisent de la toxine *in vivo* chez les rats.

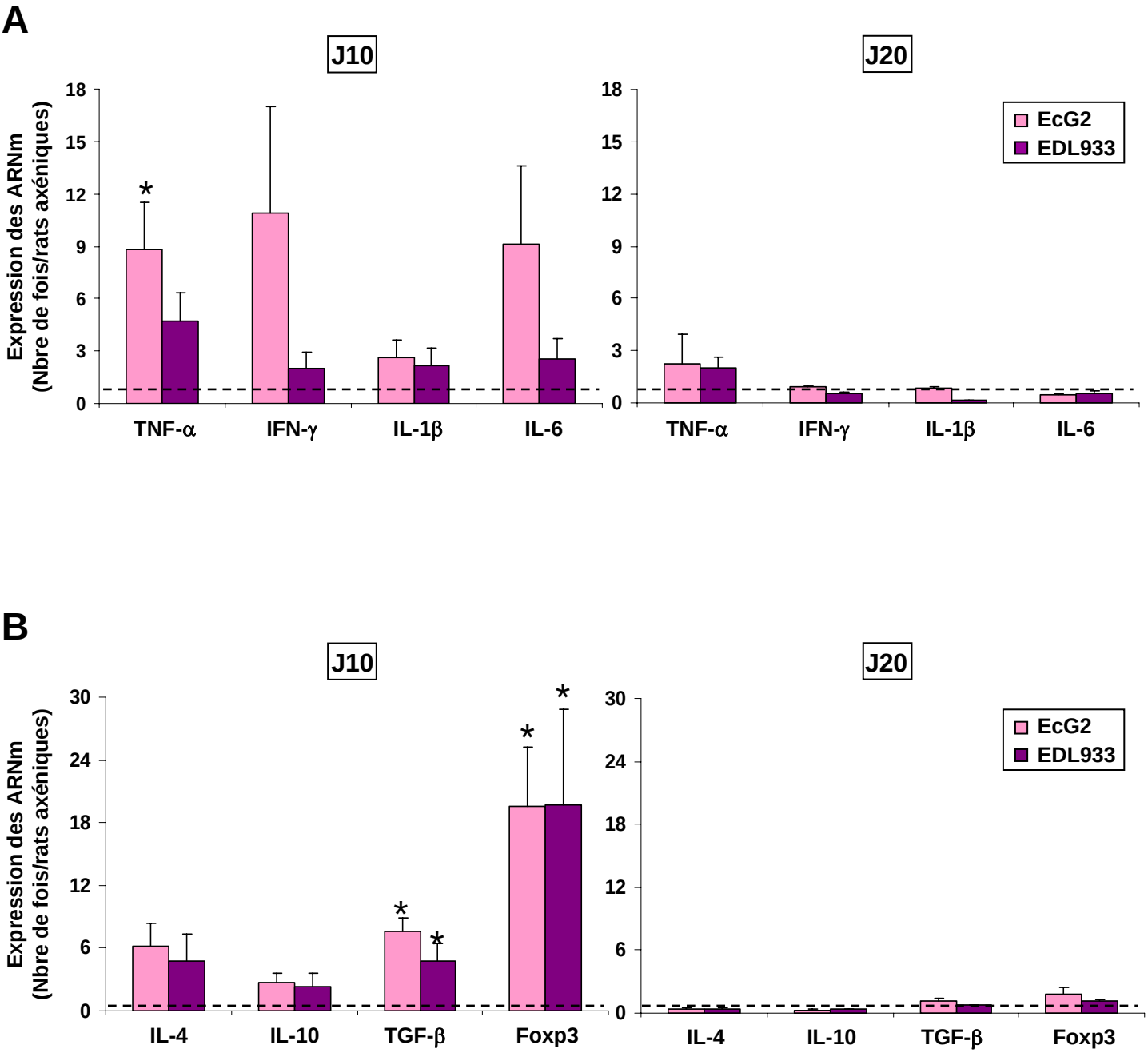
Dans le côlon, la présence des deux souches a également été mise en évidence. Environ 10^6-10^7 bactéries par g de côlon ont été détectées 10 jours après l'inoculation des animaux pour les deux souches (Fig. 3).

Figure 3: Colonisation du côlon des rats



Le nombre de bactéries a été mesuré dans le côlon des rats infectés par EDL933 ou par EcG2 pendant 10 jours; n = 5.

Figure 4: Modulation de l'expression de gènes codant pour des facteurs de la réponse immunitaire



Après 10 ou 20 jours d'infection par EcG2 ou EDL933, les côlons de rats ont été récupérés. L'expression des gènes pro-inflammatoires (A) et anti-inflammatoires (B) a été analysée par PCR semi-quantitative. *, *P*<0,05 en comparaison des rats axéniques (lignes pointillées); n = 6 dans chaque groupe.

Tableau 2: Valeurs des rapports Th1/Th2

		EcG2	EDL933
Th1/Th2			
	TNF-α / IL-4	1,43	0,99
	TNF-α / IL-10	3,22	2,01
	IFN-γ / IL-4	1,77	0,42
	IFN-γ / IL-10	3,98	0,85

Les valeurs correspondent aux rapports entre le niveau d'expression des gènes codant pour les cytokines de type 1(IFN-γ, TNF-α) et ceux de type 2 (IL-4, IL-10) obtenus par PCR semi-quantitative.

III. LA RÉPONSE IMMUNE COLIQUE

III-1. Les cytokines pro-inflammatoires

Dix jours après le début de l'expérience, une sur-expression des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires TNF-α, IFN-γ, IL-6 et dans une moindre mesure IL-1β a été observée dans le côlon distal des rats infectés par la souche EcG2 et par la souche EDL933 en comparaison des rats axéniques non infectés (Fig. 4A). Cependant, bien qu'aucun résultat ne soit statistiquement significatif, l'expression des gènes pro-inflammatoires a été moins importante chez les rats infectés par EDL933 en comparaison de la souche EcG2 (Fig. 4A). Lorsque les animaux ont été infectés pendant 20 jours par EDL933 ou par EcG2, aucune augmentation de l'expression de ces paramètres n'a été observée en comparaison des rats axéniques (Fig. 4A).

III-2. Les paramètres anti-inflammatoires

De façon similaire aux cytokines pro-inflammatoires, une sur-expression des gènes codant pour des cytokines anti-inflammatoires IL-4, IL-10 et TGF-β1 a été mise en évidence dans le côlon des rats infectés par rapport aux rats axéniques. Aucune différence entre les rats EDL933 et les rats EcG2 n'a été cependant observée. (Fig. 4B). Notons que seule l'expression du TGF-β a été augmentée de façon significative par rapport aux rats axéniques.

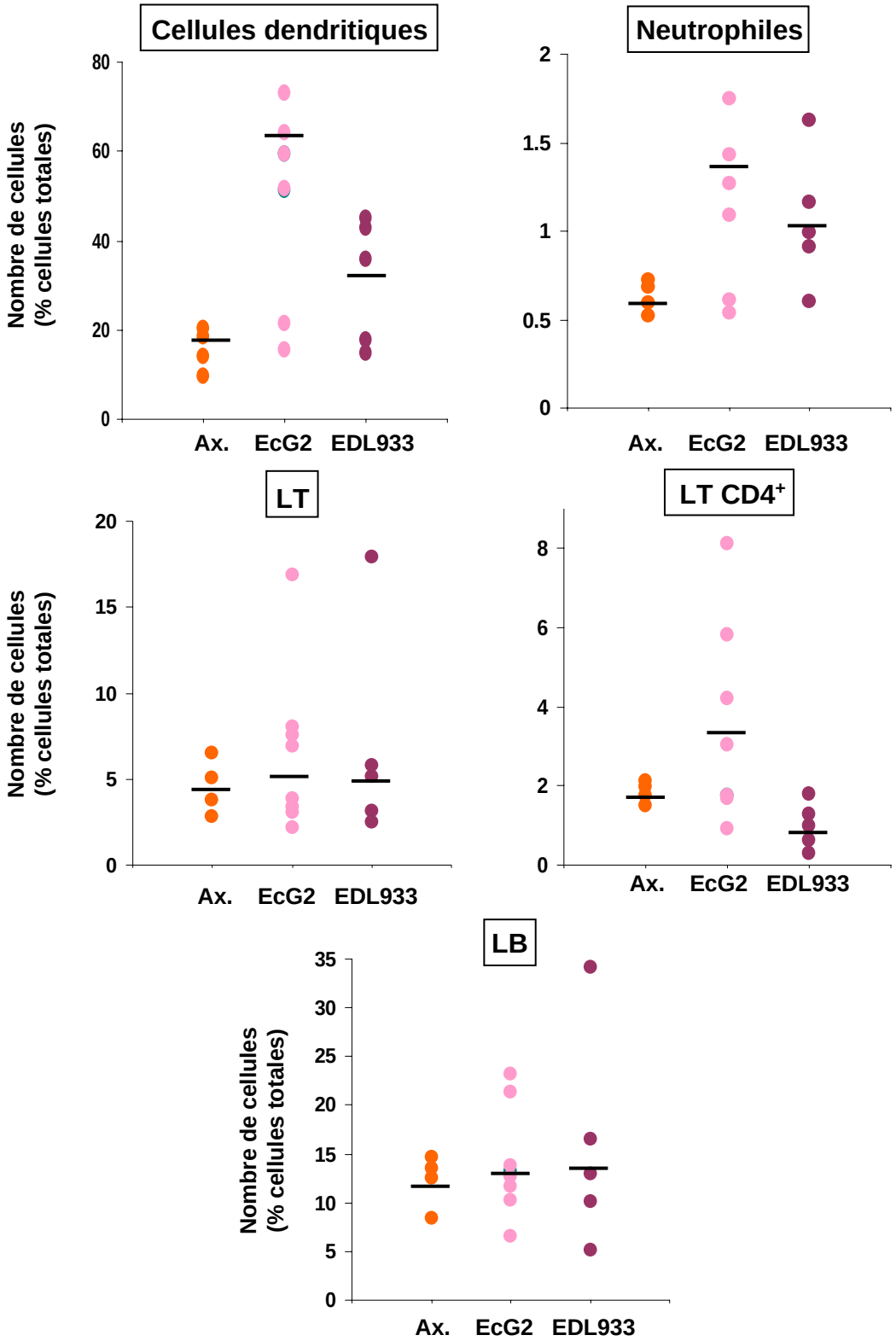
De nombreuses études ont par ailleurs démontré que les LT $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ appelés Treg sont protecteurs dans de nombreuses pathologies inflammatoires (Tiemessen MM et coll., 2007). L'expression du gène *foxp3* est un indicateur fiable de la présence de cette population lymphocytaire (Hori S et coll., 2003). Nos résultats démontrent que l'expression du gène *foxp3* a été augmentée significativement ~ 19 fois chez les rats infectés par EcG2 ou par EDL933 en comparaison des rats axéniques (Fig. 4B).

Enfin, 20 jours après le début de l'infection par EcG2 ou par EDL933, la transcription des gènes codant pour les cytokines de type 2 IL-4 et IL-10, pour le TGF-β et pour Foxp3 n'a pas été modulée par rapport aux rats axéniques (Fig. 4B).

III-3. Analyse des rapports Th1/Th2

L'analyse de la balance Th1/Th2 est un indicateur fiable de l'état inflammatoire intestinal (Horiuchi Y et coll., 2007). À partir des résultats obtenus par PCR en temps réel, nous avons calculé les rapports entre le niveau d'expression des cytokines de type 1 (IFN-γ, TNF-α) et

Figure 5: Infiltration des cellules immunes dans la muqueuse colique



Les côlons de rats axéniques (Ax) ou de rats infectés par EcG2 ou par EDL933 pendant 10 jours ont été utilisés pour détecter la présence des différentes populations de cellules immunes infiltrées dans la muqueuse par cytométrie de flux. Chaque point représente un rat et les barres correspondent aux moyennes de chaque groupe.

ceux de type 2 (IL-4, IL-10). Les rapports Th1/Th2 sont moins importants chez les rats infectés par EDL933 en comparaison des rats infectés par EcG2 (Tableau 2).

III-4. Infiltration de cellules immunitaires dans la muqueuse colique

L'inflammation du côlon est caractérisée par le recrutement de cellules myéloïdes et lymphoïdes du système immunitaire dans la muqueuse intestinale. Nous avons analysé la présence des différentes populations de cellules immunes dans les côlons de rats axéniques ou infectés par cytométrie de flux.

Nous n'avons pas observé de différence du nombre de LT et LB dans les trois groupes de rats (Fig. 5). En revanche, une augmentation du nombre de cellules dendritiques et de neutrophiles a été observée dans les rats infectés par rapport aux rats axéniques ; de plus, ces cellules ont été retrouvées en plus grand nombre dans les muqueuses de rats infectés par EcG2 par rapport aux rats infectés par EDL933 (Fig. 5). Enfin, seule l'infection par EcG2 a provoqué une infiltration modérée des LT $CD4^+$ dans les côlons (Fig. 5).

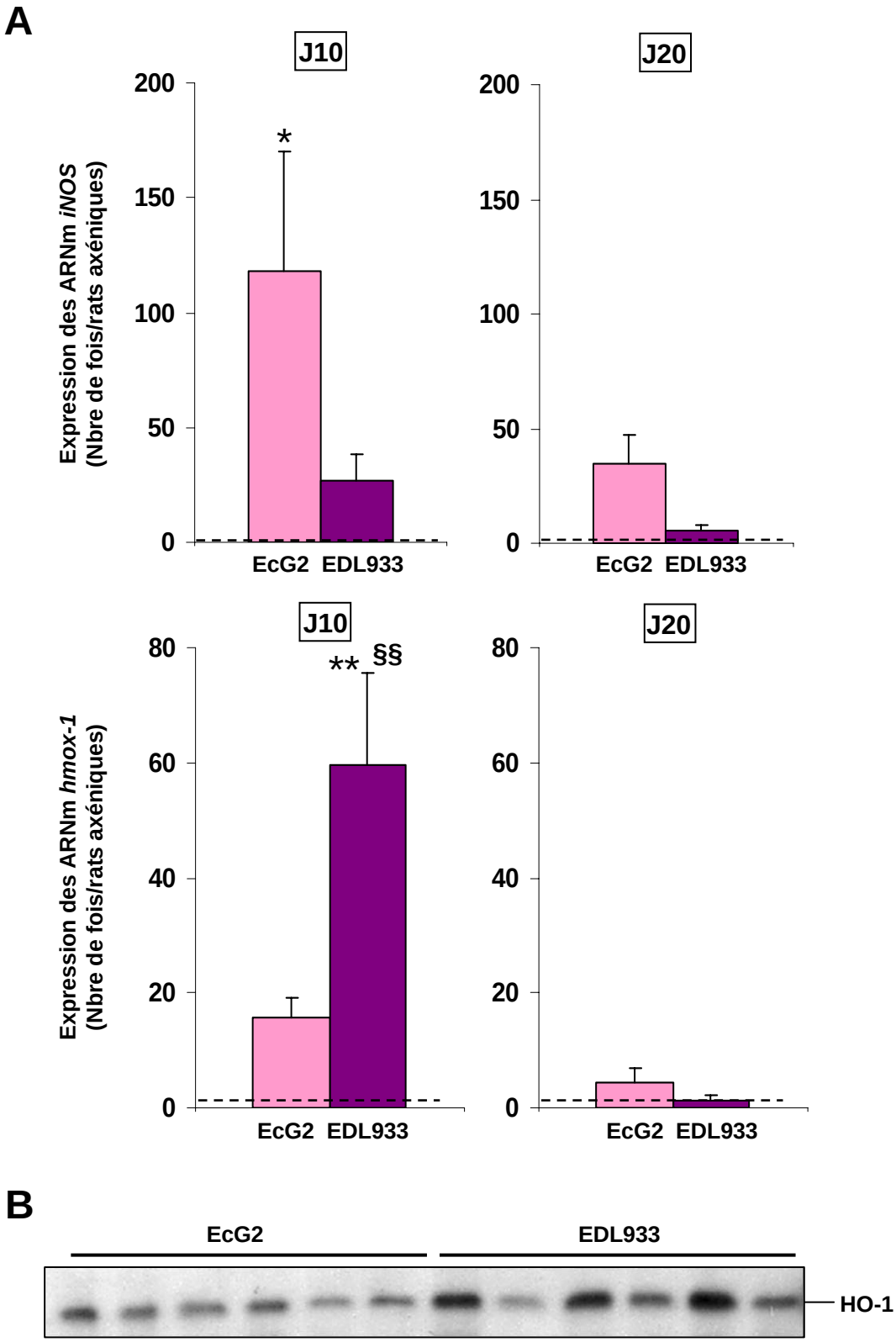
IV. ANALYSE DE LA BALANCE HO-1/iNOS

Nous avons décrit dans le chapitre précédent que les EHEC, et pas les *E. coli* commensaux, induisent l'expression du gène *hmox-1* qui code pour HO-1. En retour, l'activité de HO-1 inhibe l'expression de la iNOS. Nous avons voulu vérifier si l'expression de ces gènes était également modulée *in vivo* par les EHEC et par EcG2.

L'expression du gène codant pour la iNOS a été augmentée respectivement de 15 et 80 fois dans les côlons de rats infectés par les EHEC et par EcG2 en comparaison des rats axéniques (Fig. 6A). Inversement, l'expression du gène *hmox-1* a été induite environ 3,5 fois plus dans les côlons de rats infectés par les EHEC que dans ceux des rats infectés par EcG2 (Fig. 6A). Nous avons également observé que la protéine HO-1 est présente de façon plus importante dans les côlons de rats infectés par les EHEC que dans ceux de rats infectés par EcG2 (Fig. 6B).

Enfin, 20 jours après le début de l'infection par EcG2 ou par EDL933, la transcription des gènes codant pour la iNOS et HO-1 a été diminuée par rapport au 10ème jour ; cependant l'expression de la iNOS est restée à un niveau élevé dans les côlons de rats infectés par EcG2 (Fig. 6A).

Figure 6: Régulation de l'induction de la iNOS et de HO-1 dans les côlons de rats



L'expression des gènes *iNOS* et *hmox-1* (A) et la détection de HO-1 ont été analysées respectivement par PCR semi-quantitative et Western-blot dans le côlon de rats infectés par EcG2 ou EDL933.Pour (A), *, $P<0,05$; **, $P<0,01$ en comparaison des rats axéniques (lignes pointillées); §§, $P<0,01$ par rapport aux rats infectés par EcG2; n = 6.

DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'effet des EHEC sur la modulation de la réponse innée mucosale *in vivo* dans un modèle rat. Nous avons choisi un modèle d'infection de rats axéniques afin de s'affranchir des effets du microbiote intestinal. Ce modèle n'est donc pas le reflet de l'infection chez l'homme car le système immunitaire intestinal de rats axéniques n'est pas mature et les interactions entre les EHEC et la flore commensale ont été ignorées. Cependant, ce modèle nous a permis d'étudier l'effet isolé des EHEC sur la réponse inflammatoire intestinale. Ainsi, nous avons démontré que les EHEC induisent moins d'inflammation qu'une souche *E. coli* commensale. Ce résultat nous amène donc à poser la question suivante : Les EHEC sont-ils vraiment des pathogènes pro-inflammatoires ?

Nous avons montré que les rats infectés par les EHEC ne meurent pas malgré la colonisation du côlon par les bactéries et la production de Stx2. Cependant, nous n'avons pas analysé l'influence de l'infection sur les dommages rénaux. De ce fait, nous suggérons que *i*) la toxine n'a pas traversé la muqueuse intestinale, probablement du fait de la faible inflammation colique, ou *ii*) bien que la toxine ait franchi la barrière épithéliale, les dommages rénaux n'ont pas été suffisants pour induire une mortalité. De façon similaire à nos résultats, Eaton et coll. ont montré que des souris axéniques infectées par la souche EHEC 86-24 survivent pendant 3 semaines malgré d'importantes lésions au niveau des glomérules et une nécrose des tubules rénaux (Eaton KA et coll., 2008). De façon contradictoire, une autre étude a montré une mortalité importante des souris axéniques infectées par une souche d'EHEC hyper-virulente (Taguchi H et coll., 2002) ; cette souche, isolée d'un patient atteint de colites hémorragiques, est capable de produire Stx1 et Stx2 en plus grande quantité (de l'ordre de ~10 µg/ml) comparativement aux autres souches d'EHEC. Ainsi, le caractère particulier de cette souche pourrait expliquer la mortalité des animaux.

Dix jours après l'infection, une surexpression de plusieurs facteurs pro- et anti-inflammatoires et une infiltration de cellules immunes dans la muqueuse colique a été observée dans le côlon distal des rats infectés par la souche EcG1 ou EDL933 en comparaison des rats axéniques. Nous attribuons cet état d'activation à une maturation du système immunitaire intestinal naïf des rats axéniques. En effet, l'influence du microbiote sur le développement de la fonction immune intestinale est bien connue (Cebra JJ et coll., 1999).

Des études ont montré que l'inoculation chez des souris axéniques de microorganismes préparés à partir de fèces de souris conventionnelles génétiquement identiques entraine une inflammation aiguë au niveau du cæcum : sept jours après l'inoculation, la formation d'un œdème persistant au niveau de la sous-muqueuse et une infiltration des cellules inflammatoires dans l'espace intra-épithélial ont été observées (Fukushima K et coll., 1999). De même, un profond déficit en cellules Treg parmi la population de LT $CD4^+$ est observé dans les souris axéniques (Strauch UG et coll., 2005) ; un transfert LT $CD4^+$ de souris qui développent spontanément une inflammation de l'iléum, dans des souris athymique provoque l'apparition d'une iléite. Lorsque les souris donneuses sont axéniques, l'inflammation induite est plus importante et le gène *foxp3* est moins exprimé dans les LT $CD4^+$ (Bamias G et coll., 2007). L'ensemble de ces données souligne donc que les antigènes des bactéries commensales sont nécessaires au développement du système immunitaire intestinal.

Par ailleurs, un profil immun de la muqueuse colique identique aux rats axéniques a été observé dans les rats infectés par EcG2 ou par les EHEC pendant 20 jours. Ceci établi que ces bactéries n'ont pas induit une activation chronique de la réponse immune et que, suite à la maturation du système immunitaire, les bactéries, y compris les EHEC, ont été 'tolérées' par les animaux.

Nous avons par ailleurs observé que les gènes codant pour des facteurs pro-inflammatoires (cytokines de type 1, TNF-α, iNOS) sont moins exprimés dans les côlons de rats infectés par les EHEC que dans les muqueuses coliques de rats infectés par les *E. coli* commensaux. Ce résultat a été confirmé par la détection des cellules immunes dans les muqueuses intestinales : Les cellules dendritiques, les neutrophiles et les LT $CD4^+$ sont moins présents dans les tissus d'animaux infectés par les EHEC que dans ceux des rats colonisés par EcG2 ; cependant, ces résultats ne sont pour l'instant pas significatifs. De même, Taguchi et son équipe ont observé une congestion de la *lamina propria* et une légère infiltration de cellules inflammatoires dans le côlon de souris axéniques infectées par les EHEC (Taguchi H et coll., 2002) ; cependant, aucune infection par un *E. coli* non pathogène n'a été réalisée en parallèle dans cette étude.

En revanche, l'infection des souris axéniques par la souche EHEC EDL931 et par une souche d'*E. coli* non pathogène de laboratoire, *E. coli* MV1184, a induit une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1α et IL-6) dans les reins et dans le cerveau des animaux infectés par les EHEC en comparaison des animaux infectés par la souche d'*E. coli* non pathogène 5 jours après l'inoculation (Isogai E et coll., 1998). En revanche, les cytokines pro-inflammatoires n'ont pas été détectées dans le sérum des animaux infectés avec la souche

d'EHEC ni dans le sérum de ceux infectés avec la souche non pathogène (Isogai E et coll., 1998). Cependant, le niveau des cytokines pro-inflammatoires dans le côlon des animaux infectés n'a été analysé.

Afin de caractériser le mécanisme impliqué dans la régulation par les EHEC de la réponse pro-inflammatoire *in vivo*, nous avons exploré quatre voies immunitaires potentiellement anti-inflammatoires : Les cytokines de type Th2, la voie du TGF-β, les Treg et HO-1.

Le caractère anti-inflammatoire de la réponse Th2, caractérisée par la production d'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13, a été décrit dans un grand nombre de pathologies infectieuses et inflammatoires. Dans notre modèle animal, nous avons observé que les rapports Th1/Th2 dans les côlons de rats infectés par les EHEC sont diminués par rapport à ceux observés chez les rats infectés par EcG2. Il y a donc un déséquilibre de la balance Th1/Th2 en faveur de la réponse de type 2 dans les rats EHEC. Néanmoins, puisque EcG2 et EDL933 induisent de façon identique l'expression des ARNm des gènes codant pour l'IL-4 et l'IL-10, nous proposons que ce déséquilibre est du à une surexpression des cytokines de type 1 lors de l'infection par la souche de *E. coli* commensal plutôt qu'à une induction de la réponse Th2 par les EHEC. Il sera donc important de déterminer si le déséquilibre de la balance Th1/Th2 peut expliquer les différences d'inflammations observés entre les animaux infectés par les EHEC et ceux infectés par EcG2 ou correspond juste à un marqueur d'un état inflammatoire ?

Le TGF-β et les Treg jouent un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire. Comme pour les cytokines de type 2, nos résultats montrent une augmentation significative et similaire de l'expression du gène codant pour le TGF-β et du gène *foxp3* dans les côlons de rats infectés par les *E. coli* commensaux ou par les EHEC. Nous proposons donc que le TGF-β et les lymphocytes régulateurs ne sont pas des facteurs clés expliquant le caractère anti-inflammatoire des EHEC.

Contrairement à tous les autres paramètres analysés, nous avons observé que l'expression du gène *hmox-1* et la présence de la protéine HO-1 sont plus importantes dans les muqueuses de rats infectés par la souche d'EHEC EDL933 que dans celles de rats infectés par EcG2. HO-1 possède de nombreuses propriétés anti-oxydantes et, est impliqué dans l'inhibition de la réponse inflammatoire en inhibant l'expression des ARNm de la iNOS et des cytokines de type 1 (Lee TS and Chau LY, 2002; Hegazi RA et coll., 2005; Ryter SW et coll., 2006), mais aussi en favorisant la production des cytokines Th2 (Zenclussen AC et coll., 2005). Des études ont également montré que HO-1 inhibe la production d'IFN-γ et de NO

dans des macrophages de rats atteints de colites chroniques (Hegazi RA et coll., 2005). Nous proposons donc que l'induction de HO-1 par les EHEC *in vivo* est un élément déterminant pour expliquer que ces bactéries ont induit moins de réponses pro-inflammatoires que les *E. coli* commensaux. De plus, ce résultat confirme les études *in vitro* présentées dans le chapitre 3 montrant que les EHEC, et non les *E. coli* commensaux, induisent HO-1 dans les cellules épithéliales intestinales humaines, inhibant ainsi l'expression du gène codant pour la iNOS.

Pour conclure, les EHEC induisent une réponse pro-inflammatoire beaucoup moins importante qu'une souche d'*E. coli* commensale. Inversement, l'induction de HO-1 est induite par les EHEC et peu par les *E. coli* commensaux. Cette différence de réponse immune/inflammatoire lors de l'infection par les EHEC nous permet de proposer que ces bactéries se sont comportées comme des commensaux. Malgré la production de Stx2 par ces bactéries, nous n'avons pas observé de signes cliniques chez les rats, démontrant que ces bactéries n'ont pas provoqué d'altération de la barrière intestinale *via* l'induction d'une inflammation. Nous suggérons donc que les EHEC ne sont pas des pathogènes pro-inflammatoires.

PERSPECTIVES

Nous venons de démontrer que les EHEC induisent une réponse immune innée et inflammatoire moins importante que les *E. coli* commensaux. Néanmoins, la plupart de nos résultats ne sont pas statistiquement significatifs et des expériences complémentaires devront être réalisées. Il sera également nécessaire de réaliser des coupes histologiques sur les côlons afin *i*) d'évaluer le degré d'inflammation et *ii*) d'effectuer des immuno-marquages de la iNOS et de HO-1. Nous souhaitons également analyser l'effet de l'infection par les EHEC sur les dommages rénaux par des études histologiques.

Nous avons démontré que l'expression de HO-1 est fortement induite dans le côlon des rats infectés par les EHEC. Afin de confirmer l'implication de HO-1 dans l'inhibition de la réponse immune colique, nous envisageons de traiter une partie des rats infectés par les EHEC par un inhibiteur de HO-1.

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'infection par les EHEC est une pathologie rare mais qui peut se révéler grave, notamment chez les enfants. De nombreuses épidémies d'infection par les EHEC ont été recensées à travers le monde ces dernières années ; plus particulièrement, la plus grande épidémie jamais rencontrée en France s'est développée en Octobre 2005 dans le sud-ouest à partir de steaks hachés contaminés par des EHEC O157:H7. Ces épidémies récentes soulignent que certains aliments contaminés peuvent se retrouver sur le marché alimentaire malgré les techniques modernes de détection des STEC. Il est donc primordial et d'actualité de comprendre les interactions entre les cellules de l'homme et les STEC afin de *i*) caractériser des marqueurs de susceptibilité chez l'homme infecté, *ii*) mettre en évidence des facteurs bactériens associés à la virulence et *iii*) développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à favoriser la destruction des bactéries et limiter l'apparition des syndromes hémorragiques. C'est dans ces axes thématiques que s'est inscrit mon travail de recherche. Plus précisément, j'ai étudié la réponse immunitaire innée et la production de NO lors de l'infection par les EHEC. En effet, depuis une vingtaine d'années, de nombreuses études ont montré que NO est un agent incontournable du système immunitaire. Il est impliqué dans la pathogénicité et le contrôle des infections bactériennes et parasitaires, des cancers, des maladies auto-immunes et neuro-dégénératives.

Or, les interactions moléculaires, cellulaires et physiologiques entre NO et les EHEC n'ont jamais été étudiées à ce jour. Nous avons ainsi montré que les interactions entre les EHEC et le NO produit par les cellules épithéliales intestinales sont primordiales dans la physiopathologie des infections à EHEC.

Nous avons montré que NO diminue la production de Stx, principal facteur de virulence des EHEC. L'étude du mécanisme moléculaire nous a permis de montrer que NO interagit avec les senseurs NorR et NsrR conduisant à une diminution de la réponse SOS et de la production de phages stx2. Ainsi, l'expression des gènes *stx2* et la production de Stx2 sont diminuées. D'autre part, NO diminue l'adhésion des EHEC aux cellules épithéliales intestinales en réprimant notamment l'expression de gènes codant pour le translocon du SSTT (LEE4) *via* l'induction du système de régulation Gad.

Par ailleurs, nous avons établi que les EHEC inhibent la production de NO par les cellules épithéliales intestinales stimulées par des cytokines proinflammatoires. Les cytokines proinflammatoires, plus particulièrement IFN-γ, induisent la voie Jak-STAT conduisant à l'induction de l'expression de la iNOS et à la production de NO. Nous avons montré que les EHEC induisent l'expression du gène *hmox-1* qui code pour HO-1. Cette enzyme produit du CO qui inhibe l'activation du facteur de transcription STAT-1 induit par l'IFN-γ et par

conséquent l'expression de la iNOS. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans un modèle d'infection par les EHEC chez le rat axénique : l'expression du gène codant pour la iNOS et l'induction de paramètres pro-inflammatoires sont moins induits dans le côlon des rats infectés par les EHEC en comparaison des rats infectés par un *E. coli* commensal. Inversement, les EHEC, et pas les *E. coli* commensaux, stimulent l'expression de *hmox-1* dans la muqueuse infectée.

Ainsi, NO réprime l'expression de gènes codant pour des facteurs de virulence, et en retour, les EHEC inhibent la production de NO par les cellules épithéliales. De ces données, deux questions principales sont formulées : *i)* Les EHEC sont-ils des pathogènes pro-inflammatoires, et *ii*) Le NO peut-il représenter une nouvelle thérapie pour lutter contre les infections par les EHEC ?

I. L'INFLAMMATION DU CÔLON LORS DES INFECTIONS PAR LES EHEC

De nombreuses études *in vitro* suggèrent que les EHEC sont pro-inflammatoires car ils induisent l'activation du facteur de transcription NF-κB et la production de chimiokines, telles que l'IL-8 et CCL20, par les cellules épithéliales intestinales (Berin MC et coll., 2002; Dahan S et coll., 2002; Gobert AP et coll., 2008). Par ailleurs, des études cliniques ont montré une augmentation des cytokines pro-inflammatoires circulantes chez les enfants atteints de SHU en comparaison d'enfants souffrants d'entérites virales ou à EHEC (Fitzpatrick MM et coll., 1992).

D'autres travaux ont cependant démontré *in vitro* que les EHEC limitent l'activation de cellules épithéliales intestinales en agissant sur NF-kB ou sur STAT-1 (Ceponis PJ et coll., 2003; Hauf N and Chakraborty T, 2003; Gobert AP et coll., 2007). De la même manière, nous avons montré que les EHEC inhibent la voie de signalisation IFN-γ/Jak/STAT et par conséquent la production de NO par les cellules épithéliales intestinales activées *in vitro*. De plus, nos résultats démontrent que la réponse immune pro-inflammatoire intestinale de rats axéniques infectés par des EHEC est moins importante que celle de rats infectés par une souche d'*E. coli* commensal. Inversement, l'induction de HO-1, un médiateur anti-inflammatoire, est plus importante dans le côlon des rats infectés par les EHEC en comparaison des rats infectés par la souche commensale. Néanmoins, le lien entre l'induction de HO-1 et l'inhibition de l'expression de la iNOS et des cytokines Th1 chez le rat infecté reste à confirmer *in vivo*. Nous proposons ainsi de traiter les rats infectés avec l'inhibiteur de l'HO ZnPP et d'analyser l'expression de la iNOS et des cytokines Th1. Si HO-1 induite par

les EHEC est impliquée dans la modulation de la réponse immune colique, son inhibition devrait restaurer l'inflammation mucosale, facilitant ainsi le passage de la Stx dans le sang et le développement d'une symptomatologie plus marquée.

Dès lors, si les EHEC induisent une réponse immune modérée chez l'hôte, comment expliquer que la concentration en cytokines pro-inflammatoires est plus élevée chez les patients atteints de SHU et que le développement du SHU est lié à une inflammation du côlon facilitant le passage de la Stx ? Nous émettons l'hypothèse qu'une prédisposition génétique pourrait conduire certains patients à développer un SHU. Ainsi, des personnes produisant des taux élevés de médiateurs pro-inflammatoires auraient plus de risques de développer un SHU. Cette hypothèse est confortée par les travaux de Westerholt et coll. montrant que les ratios IL-1β/IL-10 et TNF-α/IL-10 produits par des monocytes stimulés *in vitro* par du LPS sont plus importants chez les enfants ayant développé un SHU que chez des enfants sains (Westerholt S et coll., 2000). Ceci pourrait expliquer que seulement 5 à 10% des patients infectés par les EHEC développent un SHU.

De façon intéressante, il a été décrit qu'une mutation du gène *hmox-1* peut être associée à des pathologies humaines. Il a été montré que des patients souffrant de maladies coronariennes (Kaneda H et coll., 2002) ou de diabète de type II (Chen YH et coll., 2002) présentent une augmentation du nombre de répétition des bases GT à proximité de la TATA box dans le promoteur de *hmox-1*. Cette mutation provoque une diminution de la production de HO-1 dans les cellules vasculaires. Des études cliniques ont par ailleurs montré qu'une mutation dans le promoteur de *hmox-1* conduit à une augmentation du taux de cytokines pro-inflammatoires circulantes telles que l'IL-6 et participe au développement de l'athérosclérose chez l'homme (Li P et coll., 2005). Ainsi, on peut imaginer qu'un gène *hmox-1* modifié pourrait être associé au développement du SHU : des sujets présentant une protéine HO-1 modifiée ou en moindre quantité produiraient plus de facteurs inflammatoires, favorisant ainsi une inflammation du côlon et le passage de la Stx dans le sang. Il a par ailleurs été décrit que des souris *hmox-1*$^{-/-}$ développent une hypertension rénovasculaire et des dommages rénaux importants (Wiesel P et coll., 2001). On peut donc supposer que des sujets présentant une mutation dans le gène *hmox-1* seraient plus sensibles aux dommages rénaux induits par Stx. Ainsi, il serait intéressant d'analyser le polymorphisme génétique de *hmox-1* chez des patients ayant été infectés par des EHEC et ayant développés ou non un SHU afin de déterminer si HO-1 est un facteur de risque pour le développement des symptômes hémorragiques.

Dans ce cas, l'utilisation d'inducteurs de HO-1 ou de donneurs de CO pourrait représenter une nouvelle stratégie de lutte contre le développement du SHU voire de MICI.

Ainsi, le cobalt protoporphyrine ou l'hémine, deux inducteurs de HO-1, diminuent l'inflammation du côlon et la production d'IFN-γ chez des rats présentant une colite induite par le DSS (Paul G et coll., 2005) ou une pyélonéphrite ; dans ce dernier cas, la production de NO est également diminuée (Svensson L et coll., 2008). Il est donc essentiel que nous découvrions le facteur bactérien des EHEC responsable de l'induction de HO-1. Ce dernier pourrait représenter une nouvelle molécule de choix pour lutter contre des maladies inflammatoires.

II. LA THÉRAPIE DU SHU PAR NO

NO peut avoir des effets bénéfiques ou néfastes lors des infections. D'une part, NO est antibactérien et antiparasitaire et donc peut favoriser la lutte contre les infections ; des macrophages de souris invalidées pour le gène de la iNOS perdent leur effet bactéricide vis-à-vis de *H. pylori* (Gobert AP et coll., 2001) et de *L. major* (Laskay T et coll., 1997). D'autre part, NO produit par la iNOS peut favoriser les inflammations et les troubles pathophysiologiques associés. Ainsi, lors d'une infection par *C. rodentium*, les souris iNOS$^{-/-}$ développent moins de colites et survivent plus que les souris sauvages (Gobert AP et coll., 2004) ; de même, l'inhibition de la iNOS diminue la sévérité des colites induites par le TNBS chez le rat (Kankuri E et coll., 2001). En règle générale, la contribution du NO dans les processus pathophysiologiques infectieux dépend de sa concentration, de l'endroit et du moment où il est produit.

Nous avons montré que dans les infections à EHEC, NO diminue l'expression de certains opérons du LEE et la production de Stx. Ainsi, augmenter la production de NO chez des sujets infectés par les EHEC pourrait permettre de diminuer l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales intestinales et d'inhiber la production de Stx, et, par conséquent de limiter le développement du SHU. Ainsi, contrairement à la plupart des stratégies thérapeutiques actuelles qui consistent à bloquer l'action de la Stx, NO pourrait permettre d'inhiber l'expression des gènes codant facteurs de virulence. Cependant, à l'effet inverse, l'augmentation de NO pourrait entrainer une augmentation de l'inflammation du côlon favorisant ainsi le passage de la toxine dans le sang et le développement du SHU.

L'augmentation de la concentration en NO dans la lumière intestinale chez un individu infecté par des EHEC pourrait être réalisée selon deux stratégies : Puisque les muqueuses de rats infectés par les EHEC expriment la iNOS, l'apport en arginine pourrait favoriser la production de NO endogène. Des études ont ainsi montré que l'administration d'arginine *per*

os à des souris infectées par *C. rodentium* augmente la concentration plasmatique en NO (Gobert AP et coll., 2004). Par ailleurs, l'utilisation de donneurs de NO pourrait être envisagée. Ces derniers sont utilisés couramment en médecine cardiaque et vasculaire. De plus, des donneurs de NO tels que le diéthylamine NONOate ou le sodium nitroprusside ont montré un effet protecteur lors de colites expérimentales au DSS chez la souris et au TNBS chez le rat (Salas A et coll., 2002; Lamine F et coll., 2004), suggérant que, contrairement au NO produit par les cellules de la muqueuse colique, un apport exogène de NO permettrait de lutter contre les inflammations intestinales.

Il a été démontré dans un grand nombre de modèles expérimentaux de glomérulonéphrite que la production de NO augmente le flux sanguin glomérulaire, le taux de filtration et la formation d'urine. Par ailleurs, bien que certains auteurs aient décrit qu'une production élevée de NO est associée aux dommages glomérulaires (Trachtman H et coll., 2004), d'autres ont décrit que NO pouvait limiter les inflammations rénales en favorisant la production de GMPc (Peters H et coll., 2004) et donc en limitant les processus de coagulation intraglomérulaire (Westenfeld R et coll., 2002), en inhibant l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales microvasculaires et/ou en stimulant l'angiogenèse (Ostendorf T et coll., 2004). De façon similaire, l'inhibition chronique de la production de NO par un inhibiteur de NOS induit l'hypertension rénale et la fibrose vasculaire chez le rat (Chatziantoniou C et coll., 1998). De plus, une étude clinique a démontré que l'administration d'arginine permet de lutter contre l'insuffisance rénale aigüe ischémique chez l'homme (Cherla G and Jaimes EA, 2004). Ainsi, de l'ensemble de ces données, on peut supposer que NO pourrait être protecteur lors de certaines insuffisances rénales associées à des hypertensions et des thrombi. Or, les dommages rénaux induits par la Stx sont amplifiés par l'agrégation plaquettaire sur les cellules endothéliales microvasculaires et par une hypertension. NO étant un agent vasodilatateur reconnu limitant l'agrégation des plaquettes, il pourrait également représenter un moyen de lutte pour limiter les destructions du rein, comme suggéré par Jaradat et Marquardt (Jaradat ZW and Marquardt RR, 1997). À ce titre, Siegler et coll. ont montré que la biodisponibilité du NO dans l'organisme joue un rôle crucial dans le développement du SHU (Siegler RL et coll., 2005) : Ces auteurs ont décrits un lien entre la diminution des métabolites du NO dans les urines et le développement des symptômes associés au SHU chez des singes traités par Stx1, sans modification de l'expression de la iNOS et de la eNOS au niveau rénal. De plus, il a été démontré que l'administration de N^G-nitro-L-arginine méthyl ester (NAME), un inhibiteur non spécifique des NOS, à des souris traitées par Stx2 augmente la toxicité et les dommages rénaux (Dran GI et coll., 2002), suggérant que NO est protecteur

dans un modèle murin de SHU. En revanche, le NO produit par la iNOS ne semble pas déterminant car ces auteurs n'ont pas observé d'effet du NIL sur la survie des animaux traités (Dran GI et coll., 2002). Récemment, nous avons démontré que des souris C57BL/6 invalidées pour le gène codant pour la iNOS présentent des lésions thrombotiques glomérulaires plus importantes et une survie diminuée par rapport à des souris sauvages après un traitement par Stx2. En revanche, nous n'avons pas observé l'expression de la iNOS dans les reins des souris traitées. Nous proposons donc qu'une augmentation systémique de la production de NO dépendante de la iNOS en réponse à Stx2 est protectrice lors d'un SHU expérimental. L'utilisation de donneurs de NO pour limiter l'adhésion des EHEC aux entérocytes et la production de Stx2 pourrait avoir un effet protecteur collatéral en diminuant les symptômes rénaux du SHU.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abe H, Tatsuno I, Tobe T, Okutani A and Sasakawa C (2002). Bicarbonate ion stimulates the expression of locus of enterocyte effacement-encoded genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun, **70** (7): 3500-3509.

Acheson DW and Keusch GT (1994). The shigella paradigm and colitis due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Gut, **35** (7): 872-874.

Adu-Bobie J, Frankel G, Bain C, Goncalves AG, Trabulsi LR, Douce G, Knutton S and Dougan G (1998). Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. J Clin Microbiol, **36** (3): 662-668.

Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ and Gurney AL (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. J Biol Chem, **278** (3): 1910-1914.

Ahmed MD (1998). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in central Scotland. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. Washington DC, ASM Press**:** 59-65.

Albina JE, Cui S, Mateo RB and Reichner JS (1993). Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. J Immunol, **150** (11): 5080-5085.

Aldick T, Bielaszewska M, Zhang W, Brockmeyer J, Schmidt H, Friedrich AW, Kim KS, Schmidt MA and Karch H (2007). Hemolysin from Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O26 strains injures microvascular endothelium. Microbes Infect, **9** (3): 282-290.

Algood HM, Gallo-Romero J, Wilson KT, Peek RM, Jr. and Cover TL (2007). Host response to *Helicobacter pylori* infection before initiation of the adaptive immune response. FEMS Immunol Med Microbiol, **51** (3): 577-586.

Andreoli SP, Trachtman H, Acheson DW, Siegler RL and Obrig TG (2002). Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy. Pediatr Nephrol, **17** (4): 293-298.

Angelo M, Hausladen A, Singel DJ and Stamler JS (2008). Interactions of NO with hemoglobin: from microbes to man. Methods Enzymol, **436**: 131-168.

Arbibe L, Kim DW, Batsche E, Pedron T, Mateescu B, Muchardt C, Parsot C and Sansonetti PJ (2007). An injected bacterial effector targets chromatin access for transcription factor NF-kappaB to alter transcription of host genes involved in immune responses. Nat Immunol, **8** (1): 47-56.

Asahara T, Shimizu K, Nomoto K, Hamabata T, Ozawa A and Takeda Y (2004). Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun, **72** (4): 2240-2247.

B

Ballard SA, Gingell CJ, Tang K, Turner LA, Price ME and Naylor AM (1998). Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue *in vitro* and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. J Urol, **159** (6): 2164-2171.

Bamford KB, Fan X, Crowe SE, Leary JF, Gourley WK, Luthra GK, Brooks EG, Graham DY, Reyes VE and Ernst PB (1998). Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. Gastroenterology, **114** (3): 482-492.

Bamias G, Okazawa A, Rivera-Nieves J, Arseneau KO, De La Rue SA, Pizarro TT and Cominelli F (2007). Commensal bacteria exacerbate intestinal inflammation but are not essential for the development of murine ileitis. J Immunol, **178** (3): 1809-1818.

Bang IS, Liu L, Vazquez-Torres A, Crouch ML, Stamler JS and Fang FC (2006). Maintenance of nitric oxide and redox homeostasis by the salmonella flavohemoglobin *hmp*. J Biol Chem, **281** (38): 28039-28047.

Bast DJ, Banerjee L, Clark C, Read RJ and Brunton JL (1999). The identification of three biologically relevant globotriaosyl ceramide receptor binding sites on the Verotoxin 1 B subunit. Mol Microbiol, **32** (5): 953-960.

Basu S, Pathak S, Pathak SK, Bhattacharyya A, Banerjee A, Kundu M and Basu J (2007). *Mycobacterium avium*-induced matrix metalloproteinase-9 expression occurs in a cyclooxygenase-2-dependent manner and involves phosphorylation- and acetylation-dependent chromatin modification. Cell Microbiol, **9** (12): 2804-2816.

Beaumont HJ, Lens SI, Reijnders WN, Westerhoff HV and van Spanning RJ (2004). Expression of nitrite reductase in *Nitrosomonas europaea* involves NsrR, a novel nitrite-sensitive transcription repressor. Mol Microbiol, **54** (1): 148-158.

Bell BP, Goldoft M, Griffin PM, Davis MA, Gordon DC, Tarr PI, Bartleson CA, Lewis JH, Barrett TJ, Wells JG and et al (1994). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. JAMA, **272** (17): 1349-1353.

Bell BP, Griffin PM, Lozano P, Christie DL, Kobayashi JM and Tarr PI (1997). Predictors of hemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections. Pediatrics, **100** (1): e12-.

Beltrametti F, Kresse AU and Guzman CA (1999). Transcriptional regulation of the *esp* genes of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J Bacteriol, **181** (11): 3409-3418.

Benabdallah H, Messaoudi D and Gharzouli K (2008). The spontaneous mechanical activity of the circular smooth muscle of the rabbit colon *in vitro*. Pharmacol Res, **57** (2): 132-141.

Benallaoua M, Francois M, Batteux F, Thelier N, Shyy JY, Fitting C, Tsagris L, Boczkowski J, Savouret JF, Corvol MT, Poiraudeau S and Rannou F (2007). Pharmacologic induction of heme oxygenase 1 reduces acute inflammatory arthritis in mice. Arthritis Rheum, **56** (8): 2585-2594.

Berin MC, Darfeuille-Michaud A, Egan LJ, Miyamoto Y and Kagnoff MF (2002). Role of EHEC O157:H7 virulence factors in the activation of intestinal epithelial cell NF-kappa B and MAP kinase pathways and the upregulated expression of interleukin 8. Cell Microbiol, **4** (10): 635-648.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL and Kuchroo VK (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature, **441** (7090): 235-238.

Bettelli E, Dastrange M and Oukka M (2005). Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. Proc Natl Acad Sci USA, **102** (14): 5138-5143.

Bielaszewska M, Fell M, Greune L, Prager R, Fruth A, Tschape H, Schmidt MA and Karch H (2004). Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. Infect Immun, **72** (3): 1812-1816.

Bielaszewska M, Sinha B, Kuczius T and Karch H (2005). Cytolethal distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells. Infect Immun, **73** (1): 552-562.

Birmingham CL, Canadien V, Kaniuk NA, Steinberg BE, Higgins DE and Brumell JH (2008). Listeriolysin O allows *Listeria monocytogenes* replication in macrophage vacuoles. Nature, **451** (7176): 350-354.

Bjork S, Breimer ME, Hansson GC, Karlsson KA and Leffler H (1987). Structures of blood group glycosphingolipids of human small intestine. A relation between the expression of fucolipids of epithelial cells and the ABO, Le and Se phenotype of the donor. J Biol Chem, **262** (14): 6758-6765.

Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Gonzalez EA, Mora A, Prado C, Fernandez L, Rio M, Ramos J and Alonso MP (1996). Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle. Epidemiol Infect, **117** (2): 251-257.

Bodenmiller DM and Spiro S (2006). The yjeB (nsrR) gene of *Escherichia coli* encodes a nitric oxide-sensitive transcriptional regulator. J Bacteriol, **188** (3): 874-881.

Boerlin P (1999). Evolution of virulence factors in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. Cell and Mol Life Sci, **56** (9): 735-741.

Brigotti M, Caprioli A, Tozzi AE, Tazzari PL, Ricci F, Conte R, Carnicelli D, Procaccino MA, Minelli F, Ferretti AVS, Paglialonga F, Edefonti A and Rizzoni G (2006). Shiga toxins present in the gut and in the polymorphonuclear leukocytes circulating in the blood of children with hemolytic-uremic syndrome.2006. J Clin Microbiol, **44** (2): 313-317.

Brockhaus F and Brune B (1998). U937 apoptotic cell death by nitric oxide: Bcl-2 downregulation and caspase activation. Exp Cell Res, **238** (1): 33-41.

Brunder W, Schmidt H and Karch H (1997). EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. Mol Microbiol, **24** (4): 767-778.

Brunelli L, Crow JP and Beckman JS (1995). The comparative toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to *Escherichia coli*. Arch Biochem Biophys, **316** (1): 327-334.

Burk C, Dietrich R, Acar G, Moravek M, Bulte M and Martlbauer E (2003). Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. J Clin Microbiol, **41** (5): 2106-2112.

Bussiere FI, Chaturvedi R, Cheng Y, Gobert AP, Asim M, Blumberg DR, Xu H, Kim PY, Hacker A, Casero RA, Jr. and Wilson KT (2005). Spermine causes loss of innate immune response to *Helicobacter pylori* by inhibition of inducible nitric-oxide synthase translation. J Biol Chem, **280** (4): 2409-2412.

C

Calderwood SB and Mekalanos JJ (1987). Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus. J Bacteriol, **169** (10): 4759-4764.

Cameron ML, Granger DL, Weinberg JB, Kozumbo WJ and Koren HS (1990). Human alveolar and peritoneal macrophages mediate fungistasis independently of L-arginine oxidation to nitrite or nitrate. Am Rev Respir Dis, **142** (6 Pt 1): 1313-1319.

Cammack R, Shergill JK, Ananda Inalsingh V and Hughes MN (1998). Applications of electron paramagnetic resonance spectroscopy to study interactions of iron proteins in cells with nitric oxide. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, **54A** (14): 2393-2402.

Carlisle MS, McGregor DD and Appleton JA (1991). The role of the antibody Fc region in rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in suckling rats. Immunology, **74** (3): 552-558.

Cashen DE, MacIntyre DE and Martin WJ (2002). Effects of sildenafil on erectile activity in mice lacking neuronal or endothelial nitric oxide synthase. Br J Pharmacol, **136** (5): 693-700.

Castanie-Cornet MP, Treffandier H, Francez-Charlot A, Gutierrez C and Cam K (2007). The glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*: essential and dual role of the His-Asp phosphorelay RcsCDB/AF. Microbiology, **153** (Pt 1): 238-246.

Cebra JJ (1999). Influences of microbiota on intestinal immune system development. Am J Clin Nutr, **69** (5): 1046S-1051.

Ceponis PJ, McKay DM, Ching JC, Pereira P and Sherman PM (2003). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 disrupts Stat1-mediated gamma interferon signal transduction in epithelial cells. Infect Immun, **71** (3): 1396-1404.

Chatziantoniou C, Boffa JJ, Ardaillou R and Dussaule JC (1998). Nitric oxide inhibition induces early activation of type I collagen gene in renal resistance vessels and glomeruli in transgenic mice. Role of endothelin. J Clin Invest, **101** (12): 2780-9.

Chauviere G, Coconnier MH, Kerneis S, Darfeuille-Michaud A, Joly B and Servin AL (1992). Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (ETEC) from human enterocyte-like Caco-2 cells by heat-killed Lactobacillus. FEMS Microbiol Lett, **70** (3): 213-217.

Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G and Wahl SM (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. J Exp Med, **198** (12): 1875-1886.

Chen YH, Lin SJ, Lin MW, Tsai HL, Kuo SS, Chen JW, Charng MJ, Wu TC, Chen LC, Ding YA, Pan WH, Jou YS and Chau LY (2002). Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients. Hum Genet, **111** (1): 1-8.

Cheng HC, Skehan BM, Campellone KG, Leong JM and Rosen MK (2008). Structural mechanism of WASP activation by the enterohaemorrhagic *E. coli* effector EspF(U). Nature, **454** (7207): 1009-1013.

Cherla G and Jaimes EA (2004).Role of L-arginine in the pathogenesis and treatment of renal disease. J Nutr, **134** (10 suppl): 2801-2806.

Cheville AM, Arnold KW, Buchrieser C, Cheng CM and Kaspar CW (1996). rpoS regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. Appl Environ Microbiol, **62** (5): 1822-1824.

China B, Jacquemin E, Devrin AC, Pirson V and Mainil J (1999). Heterogeneity of the eae genes in attaching/effacing *Escherichia coli* from cattle: comparison with human strains. Res Microbiol, **150** (5): 323-332.

Chopra P, Verma D, Khullar M, Sapru S and Mahmood S (2006). Shiga toxin exposure modulates intestinal brush border membrane functional proteins in rabbit ileum. Mol Cell Biochem, **283** (1): 85-92.

Clementi E and Nisoli E (2005). Nitric oxide and mitochondrial biogenesis: a key to long-term regulation of cellular metabolism. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, **142** (2): 102-110.

Cong Y, Brandwein SL, McCabe RP, Lazenby A, Birkenmeier EH, Sundberg JP and Elson CO (1998). CD4+ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease. J Exp Med, **187** (6): 855-864.

Corry DB and Kheradmand F (1999). Induction and regulation of the IgE response. Nature, **402** (6760 Suppl): B18-23.

Crack J, Green J and Thomson AJ (2004). Mechanism of oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR). J Biol Chem, **279** (10): 9278-9286.

Craven PA and DeRubertis FR (1978). Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins. Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation. J Biol Chem, **253** (23): 8433-8443.

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA and Sedgwick JD (2003). Interleukin-23

rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature, **421** (6924): 744-748.

Czerucka D, Dahan S, Mograbi B, Rossi B and Rampal P (2001). Implication of mitogen-activated protein kinases in T84 cell responses to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. Infect Immun, **69** (3): 1298-1305.

D

D'Autreaux B, Touati D, Bersch B, Latour JM and Michaud-Soret I (2002). Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. Proc Natl Acad Sci USA, **99** (26): 16619-16624.

D'Autreaux B, Tucker NP, Dixon R and Spiro S (2005). A non-haem iron centre in the transcription factor NorR senses nitric oxide. Nature, **437** (7059): 769-772.

Dahan S, Busuttil V, Imbert V, Peyron JF, Rampal P and Czerucka D (2002). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection induces interleukin-8 production via activation of mitogen-activated protein kinases and the transcription factors NF-kappa B and AP-1 in T84 cells. Infect Immun, **70** (5): 2304-2310.

Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiez L, Joly B, Cortot A and Colombel JF (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. Gastroenterology, **115** (6): 1405-1413.

Datsenko KA and Wanner BL (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci USA, **97** (12): 6640-6645.

Davidson NJ, Leach MW, Fort MM, Thompson-Snipes L, Kuhn R, Muller W, Berg DJ and Rennick DM (1996). T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. J Exp Med, **184** (1): 241-251.

de Grado M, Rosenberger CM, Gauthier A, Vallance BA and Finlay BB (2001). Enteropathogenic *Escherichia coli* infection induces expression of the early growth response factor by activating mitogen-activated protein kinase cascades in epithelial cells. Infect Immun, **69** (10): 6217-6224.

De Nadai C, Sestili P, Cantoni O, Lievremont JP, Sciorati C, Barsacchi R, Moncada S, Meldolesi J and Clementi E (2000). Nitric oxide inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by reducing the generation of ceramide. Proc Natl Acad Sci U S A, **97** (10): 5480-5485.

de Sablet T, Bertin Y, Vareille M, Girardeau JP, Garrivier A, Gobert AP and Martin C (2008). Differential expression of stx2 variants in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* belonging to seropathotypes A and C. Microbiology, **154** (Pt 1): 176-186.

Delhase M, Hayakawa M, Chen Y and Karin M (1999). Positive and negative regulation of I kappa B kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. Science, **284** (5412): 309-313.

Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C and Chen ZJ (2000). Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. Cell, **103** (2): 351-361.

Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Vallance BA, Vazquez A, Barba J, Ibarra JA, O'Donnell P, Metalnikov P, Ashman K, Lee S, Goode D, Pawson T and Finlay BB (2004). Dissecting virulence: Systematic and functional analyses of a pathogenicity island. Proc Natl Acad Sci USA, **101** (10): 3597-3602.

Deng W, Vallance BA, Li Y, Puente JL and Finlay BB (2003). Citrobacter rodentium translocated intimin receptor (Tir) is an essential virulence factor needed for actin condensation, intestinal colonization and colonic hyperplasia in mice. Mol Microbiol, **48** (1): 95-115.

Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M and Zeiher AM (1997). Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. J Exp Med, **185** (4): 601-607.

DiPaolo RJ, Brinster C, Davidson TS, Andersson J, Glass D and Shevach EM (2007). Autoantigen-specific TGFbeta-induced Foxp3+ regulatory T cells prevent autoimmunity by inhibiting dendritic cells from activating autoreactive T cells. J Immunol, **179** (7): 4685-4693.

Donnenberg MS, Tzipori S, McKee ML, O'Brien AD, Alroy J and Kaper JB (1993). The role of the eae gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment *in vitro* and in a porcine model. J Clin Invest, **92** (3): 1418-1424.

Dran GI, Fernandez GC, Rubel CJ, Bermejo E, Gomez S, Meiss R, Isturiz MA and Palermo MS (2002). Protective role of nitric oxide in mice with Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. Kidney Int, **62** (4): 1338-1348.

Dydensborg AB, Herring E, Auclair J, Tremblay E and Beaulieu JF (2006). Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, **290** (5): G1067-1074.

Dytoc M, Fedorko L and Sherman PM (1994). Signal transduction in human epithelial cells infected with attaching and effacing *Escherichia coli in vitro*. Gastroenterology, **106** (5): 1150-1161.

E

Eaton KA, Friedman DI, Francis GJ, Tyler JS, Young VB, Haeger J, Abu-Ali G and Whittam TS (2008). Pathogenesis of renal disease due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* in germ-free mice. Infect Immun, **76** (7): 3054-3063.

Eaves-Pyles T, Murthy K, Liaudet L, Virag L, Ross G, Soriano FG, Szabo C and Salzman AL (2001). Flagellin, a novel mediator of *Salmonella*-induced epithelial activation and systemic inflammation: I kappa B alpha degradation, induction of nitric oxide synthase, induction of proinflammatory mediators, and cardiovascular dysfunction. J Immunol, **166** (2): 1248-1260.

Elder RO, Keen JE, Siragusa GR, Barkocy-Gallagher GA, Koohmaraie M and Laegreid WW (2000). Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. Proc Natl Acad Sci USA, **97** (7): 2999-3003.

Ellies LG, Fishman M, Hardison J, Kleeman J, Maglione JE, Manner CK, Cardiff RD and MacLeod CL (2003). Mammary tumor latency is increased in mice lacking the inducible nitric oxide synthase. Int J Cancer, **106** (1): 1-7.

Elliott SJ, Sperandio V, Giron JA, Shin S, Mellies JL, Wainwright L, Hutcheson SW, McDaniel TK and Kaper JB (2000). The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect. Immun., **68** (11): 6115-6126.

Elson CO, Cong Y, Weaver CT, Schoeb TR, McClanahan TK, Fick RB and Kastelein RA (2007). Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. Gastroenterology, **132** (7): 2359-2370.

Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, Takeda Y, Ogasawara T and Igarashi K (1988). Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. Eur J Biochem, **171** (1-2): 45-50.

Escobar-Paramo P, Clermont O, Blanc-Potard AB, Bui H, Le Bouguenec C and Denamur E (2004). A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. Mol Biol Evol, **21** (6): 1085-1094.

Espie E, Grimont F, Vaillant V, Montet MP, Carle I, Bavai C, de Valk H and Vernozy-Rozand C (2006). O148 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreak: microbiological investigation as a useful complement to epidemiological investigation. Clin Microbiol Infect, **12** (10): 992-998.

F

Fairbanks G, Steck TL and Wallach DF (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry, **10** (13): 2606-2617.

Fernandez de Henestrosa AR, Ogi T, Aoyagi S, Chafin D, Hayes JJ, Ohmori H and Woodgate R (2000). Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. Mol Microbiol, **35** (6): 1560-1572.

Filenko N, Spiro S, Browning DF, Squire D, Overton TW, Cole J and 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** (12): 4410-4417.

Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FH, Ackerman K, Haley K, Galle PR, Szabo SJ, Drazen JM, De Sanctis GT and Glimcher LH (2002). Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. Science, **295** (5553): 336-338.

Fitzpatrick MM, Shah V, Trompeter RS, Dillon MJ and Barratt TM (1992). Interleukin-8 and polymorphoneutrophil leucocyte activation in hemolytic uremic syndrome of childhood. Kidney Int, **42** (4): 951-956.

Flatley J, Barrett J, Pullan ST, Hughes MN, Green J and Poole RK (2005). Transcriptional responses of *Escherichia coli* to S-nitrosoglutathione under defined chemostat conditions reveal major changes in methionine biosynthesis. J Biol Chem, **280** (11): 10065-10072.

Fontenot JD, Gavin MA and Rudensky AY (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol, **4** (4): 330-336.

Foster JW (2004). Escherichia coli acid resistance tales of amateur acidophile. Nat Rev Micro, **2** (11): 898-907.

Frankel G, Candy DC, Fabiani E, Adu-Bobie J, Gil S, Novakova M, Phillips AD and Dougan G (1995). Molecular characterization of a carboxy-terminal eukaryotic-cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun, **63** (11): 4323-4328.

Friedberg D, Umanski T, Fang Y and Rosenshine I (1999). Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol Microbiol, **34** (5): 941-952.

Fuchs S, Muhldorfer I, Donohue-Rolfe A, Kerenyi M, Emody L, Alexiev R, Nenkov P and Hacker J (1999). Influence of RecA on *in vivo* virulence and Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* pathogens. Microb Pathog, **27** (1): 13-23.

Fujii J, Kita T, Yoshida S, Takeda T, Kobayashi H, Tanaka N, Ohsato K and Mizuguchi Y (1994). Direct evidence of neuron impairment by oral infection with verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H- in mitomycin-treated mice. Infect Immun, **62** (8): 3447-3453.

Fukushima K, Sasaki I, Ogawa H, Naito H, Funayama Y and Matsuno S (1999). Colonization of microflora in mice: mucosal defense against luminal bacteria. J Gastroenterol, **34** (1): 54-60.

Funatogawa K, Ide T, Kirikae F, Saruta K, Nakano M and Kirikae T (2002). Use of immunoglobulin enriched bovine colostrum against oral challenge with enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in mice. Microbiol Immunol, **46** (11): 761-766.

Furchgott RF and Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature, **288** (5789): 373-376.

Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C and Strober W (1996). Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease.

Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. J Immunol, **157** (3): 1261-1270.

G

Gamage SD, Patton AK, Strasser JE, Chalk CL and Weiss AA (2006). Commensal bacteria influence *Escherichia coli* O157:H7 persistence and Shiga toxin production in the mouse intestine. Infect Immun, **74** (3): 1977-1983.

Ganster RW, Taylor BS, Shao L and Geller DA (2001). Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B. Proc Natl Acad Sci USA, **98** (15): 8638-8643.

Gao J, Morrison DC, Parmely TJ, Russell SW and Murphy WJ (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** (2): 1226-1230.

Garmendia J, Carlier M-F, Egile C, Didry D and Frankel G (2006). Characterization of TccP-mediated N-WASP activation during enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection. Cell Microbiol, **8** (9): 1444-1455.

Garmendia J, Phillips AD, Carlier M-F, Chong Y, Schuller S, Marches O, Dahan S, Oswald E, Shaw RK, Knutton S and Frankel G (2004). TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. Cell Microbiol, **6** (12): 1167-1183.

Garred O, Dubinina E, Holm PK, Olsnes S, Van Deurs B, Kozlov JV and Sandvig K (1995). Role of processing and intracellular transport for optimal toxicity of shiga toxin and toxin mutants. Exp Cell Res, **218** (1): 39-49.

Gauthier A and Finlay BB (2003). Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol, **185** (23): 6747-6755.

Geelen JM, van der Velden TJAM, te Loo DMWM, Boerman OC, van den Heuvel LPWJ and Monnens LAH (2007). Lack of specific binding of Shiga-like toxin (verocytotoxin) and non-specific interaction of Shiga-like toxin 2 antibody with human polymorphonuclear leucocytes. Nephrol Dial Transplant, **22** (3): 749-755.

Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ and Madara JL (2001). Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. J Immunol, **167** (4): 1882-1885.

Giangrossi M, Zattoni S, Tramonti A, De Biase D and Falconi M (2005). Antagonistic role of H-NS and GadX in the regulation of the glutamate decarboxylase-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*. J Biol Chem, **280** (22): 21498-21505.

Gilberthorpe NJ and Poole RK (2008). Nitric oxide homeostasis in *Salmonella typhimurium*: roles of respiratory nitrate reductase and flavohemoglobin. J Biol Chem, **283** (17): 11146-11154.

Gillis S (1996). The thrombocytopenic purpuras. Recognition and management. Drugs, **51** (6): 942-953.

Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zahringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ and Philpott DJ (2003). Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. Science, **300** (5625): 1584-1587.

Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ and Sansonetti PJ (2003). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. J Biol Chem, **278** (11): 8869-8872.

Girardin SE, Tournebize R, Mavris M, Page AL, Li X, Stark GR, Bertin J, DiStefano PS, Yaniv M, Sansonetti PJ and Philpott DJ (2001). CARD4/Nod1 mediates NF-kappa B and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. EMBO Rep, **2** (8): 736-742.

Gobert AP, Cheng Y, Akhtar M, Mersey BD, Blumberg DR, Cross RK, Chaturvedi R, Drachenberg CB, Boucher JL, Hacker A, Casero RAJ and Wilson KT (2004). Protective role of arginase in a mouse model of colitis. J Immunol, **173** (3): 2109-2117.

Gobert AP, Coste A, Guzman CA, Vareille M, Hindre T, de Sablet T, Girardeau JP and Martin C (2008). Modulation of chemokine gene expression by Shiga-toxin producing *Escherichia coli* belonging to various origins and serotypes. Microbes Infect, **10** (2): 159-165.

Gobert AP, Daulouede S, Lepoivre M, Boucher JL, Bouteille B, Buguet A, Cespuglio R, Veyret B and Vincendeau P (2000). L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. Infect Immun, **68** (8): 4653-4657.

Gobert AP, McGee DJ, Akhtar M, Mendz GL, Newton JC, Cheng Y, Mobley HL and Wilson KT (2001). *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. Proc Natl Acad Sci U S A, **98** (24): 13844-13849.

Gobert AP, Mersey BD, Cheng Y, Blumberg DR, Newton JC and Wilson KT (2002). Cutting edge: urease release by *Helicobacter pylori* stimulates macrophage inducible nitric oxide synthase. J Immunol, **168** (12): 6002-6006.

Gobert AP, Vareille M, Glasser A-L, Hindre T, de Sablet T and Martin C (2007). Shiga Toxin Produced by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Inhibits PI3K/NF-{kappa}B Signaling Pathway in Globotriaosylceramide-3-Negative Human Intestinal Epithelial Cells. J Immunol, **178** (12): 8168-8174.

Gobert AP, Vincendeau P, Mossalayi D and Veyret B (1999). Mechanism of extracellular thiol nitrosylation by N_2O_3 produced by activated macrophages. Nitric Oxide, **3** (6): 467-472.

Gobert AP, Wilson KT and Martin C (2005). Cellular responses to attaching and effacing bacteria: activation and implication of the innate immune system. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), **53** (3): 234-244.

Goldstein S and Merenyi G (2008). The chemistry of peroxynitrite: implications for biological activity. Methods Enzymol, **436**: 49-61.

Goncalves NS, Ghaem-Maghami M, Monteleone G, Frankel G, Dougan G, Lewis DJ, Simmons CP and MacDonald TT (2001). Critical role for tumor necrosis factor alpha in controlling the number of lumenal pathogenic bacteria and immunopathology in infectious colitis. Infect Immun, **69** (11): 6651-6659.

Gong S, Ma Z and Foster JW (2004). The Era-like GTPase TrmE conditionally activates *gadE* and glutamate-dependent acid resistance in *Escherichia coli*. Mol Microbiol, **54** (4): 948-961.

Green EA, Choi Y and Flavell RA (2002). Pancreatic lymph node-derived CD4(+)CD25(+) Treg cells: highly potent regulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals. Immunity, **16** (2): 183-191.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE and Roncarolo MG (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. Nature, **389** (6652): 737-742.

Guessous F, Marcinkiewicz M, Polanowska-Grabowska R, Kongkhum S, Heatherly D, Obrig T and Gear A (2005). Shiga toxin 2 and lipopolysaccharide induce human microvascular endothelial cells to release chemokines and factors that stimulate platelet function. Infect Immun, 7**3** (12): 8306-16.

H

Haddad JE and Jackson MP (1993). Identification of the Shiga toxin A-subunit residues required for holotoxin assembly. J Bacteriol, **175** (23): 7652-7657.

Harmon BG, Brown CA, Tkalcic S, Mueller PO, Parks A, Jain AV, Zhao T and Doyle MP (1999). Fecal shedding and rumen growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fasted calves. J Food Prot, **62** (6): 574-579.

Hasegawa M, Fujimoto Y, Lucas PC, Nakano H, Fukase K, Nunez G and Inohara N (2008). A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappa B activation. EMBO J, **27** (2): 373-383.

Hauf N and Chakraborty T (2003). Suppression of NF-kappa B activation and proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J Immunol, **170** (4): 2074-2082.

Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spottl T, Andus T, Scholmerich J, Herfarth H, Ray K, Falk W and Rogler G (2002). Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. Gastroenterology, **122** (7): 1987-2000.

Hegazi RA, Rao KN, Mayle A, Sepulveda AR, Otterbein LE and Plevy SE (2005). Carbon monoxide ameliorates chronic murine colitis through a heme oxygenase 1-dependent pathway. J Exp Med, **202** (12): 1703-1713.

Helgeland L, Vaage JT, Rolstad B, Midtvedt T and Brandtzaeg P (1996). Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. Immunology, **89** (4): 494-501.

Hibbs JB, Jr. (2002). Infection and nitric oxide. J. Infect. Dis., **185** Suppl 1: S9-17.

Hidalgo E and Demple B (1994). An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein. EMBO J, **13** (1): 138-146.

Higgins LM, Frankel G, Douce G, Dougan G and MacDonald TT (1999). *Citrobacter rodentium* infection in mice elicits a mucosal Th1 cytokine response and lesions similar to those in murine inflammatory bowel disease. Infect Immun, **67** (6): 3031-3039.

Holgersson J, Jovall PA and Breimer ME (1991). Glycosphingolipids of human large intestine: detailed structural characterization with special reference to blood group compounds and bacterial receptor structures. J Biochem (Tokyo), **110** (1): 120-131.

Homer KL and Wanstall JC (2002). Inhibition of rat platelet aggregation by the diazeniumdiolate nitric oxide donor MAHMA NONOate. Br J Pharmacol, **137** (7): 1071-1081.

Hori S, Nomura T and Sakaguchi S (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science, **299** (5609): 1057-1061.

Horiuchi Y, Hanazawa A, Nakajima Y, Nariai Y, Asanuma H, Kuwabara M, Yukawa M and Ito H (2007). T-helper (Th)1/Th2 imbalance in the peripheral blood of dogs with malignant tumor. Microbiol Immunol, **51** (11): 1135-1138.

Horwitz DA, Zheng SG and Gray JD (2008). Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. Trends Immunol, **29** (9): 429-435.

Hsu HY, Chu LC, Hua KF and Chao LK (2008). Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of curcumin within LPS-stimulated human monocytes. J cell Physiol, **215** (3): 603-12.

Huang J, DeGraves FJ, Lenz SD, Gao D, Feng P, Li D, Schlapp T and Kaltenboeck B (2002). The quantity of nitric oxide released by macrophages regulates Chlamydia-induced disease. Proc Natl Acad Sci USA, **99** (6): 3914-3919.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M and Thomas G (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature, **411** (6837): 599-603.

Hurley BP, Jacewicz M, Thorpe CM, Lincicome LL, King AJ, Keusch GT and Acheson DW (1999). Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. Infect Immun, **67** (12): 6670-6677.

Hurley BP, Thorpe CM and Acheson DWK (2001). Shiga Toxin Translocation across Intestinal Epithelial Cells Is Enhanced by Neutrophil Transmigration. Infect Immun, **69** (10): 6148-6155.

Hussein HS (2007). Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. J Anim Sci, **85** (13 Suppl): E63-72.

Hutchings MI, Mandhana N and Spiro S (2002). The NorR protein of *Escherichia coli* activates expression of the flavorubredoxin gene *norV* in response to reactive nitrogen species. J Bacteriol, **184** (16): 4640-4643.

I

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE and Chaudhuri G (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci USA, **84** (24): 9265-9269.

Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC and Kamradt T (2000). Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. J Immunol, **165** (11): 6107-6115.

Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A and Nunez G (2001). Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. J Biol Chem, **276** (4): 2551-2554.

Inward CD, Varagunam M, Adu D, Milford DV and Taylor CM (1997). Cytokines in haemolytic uraemic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection. Arch Dis Child, **77** (2): 145-147.

Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B and Speed TP (2003). Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. Nucleic Acids Res, **31** (4): e15.

Isogai E, Isogai H, Kimura K, Hayashi S, Kubota T, Fujii N and Takeshi K (1998). Role of tumor necrosis factor alpha in gnotobiotic mice infected with an *Escherichia coli* O157:H7 strain. Infect Immun, **66** (1): 197-202.

Ito H, Terai A, Kurazono H, Takeda Y and Nishibuchi M (1990). Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. Microb Pathog, **8** (1): 47-60.

Iyoda S and Watanabe H (2005). ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J Bacteriol, **187** (12): 4086-4094.

J

Jandu N, Ceponis PJ, Kato S, Riff JD, McKay DM and Sherman PM (2006). Conditioned medium from enterohemorrhagic *Escherichia coli*-infected T84 cells inhibits signal transducer and activator of transcription 1 activation by gamma interferon. Infect Immun, **74** (3): 1809-1818.

Jandu N, Shen S, Wickham ME, Prajapati R, Finlay BB, Karmali MA and Sherman PM (2007). Multiple seropathotypes of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) disrupt interferon-gamma-induced tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)-1. Microb Pathog, **42** (2-3): 62-71.

Janion C (2001). Some Provocative Thoughts on Damage and Repair of DNA. J Biomed Biotechnol, **1** (2): 50-51.

Janka A, Bielaszewska M, Dobrindt U, Greune L, Schmidt MA and Karch H (2003). Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: Characterization and evolutionary considerations. Infect Immun, **71** (6): 3634-3638.

Jaradat ZW and Marquardt RR (1997). L-arginine as a therapeutic approach for the verotoxigenic *Escherichia coli*-induced hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. Med Hypotheses, **49** (3): 277-280.

Jenkins C, Pearce MC, Chart H, Cheasty T, Willshaw GA, Gunn GJ, Dougan G, Smith HR, Synge BA and Frankel G (2002). An eight-month study of a population of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in a Scottish cattle herd. J Appl Microbiol, **93** (6): 944-953.

Johnson KE, Thorpe CM and Sears CL (2006). The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Clin Infect Dis, **43** (12): 1587-1595.

Jones-Carson J, Laughlin J, Hamad MA, Stewart AL, Voskuil MI and Vazquez-Torres A (2008). Inactivation of [Fe-S] metalloproteins mediates nitric oxide-dependent killing of *Burkholderia mallei*. PLoS ONE, **3** (4): e1976.

Justino MC, Vicente JB, Teixeira M and Saraiva LM (2005). New genes implicated in the protection of anaerobically grown *Escherichia coli* against nitric oxide. J Biol Chem, **280** (4): 2636-2643.

K

Kanamaru K, Kanamaru K, Tatsuno I, Tobe T and Sasakawa C (2000). SdiA, an *Escherichia coli* homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence factors in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Mol Microbiol, **38** (4): 805-816.

Kaneda H, Ohno M, Taguchi J, Togo M, Hashimoto H, Ogasawara K, Aizawa T, Ishizaka N and Nagai R (2002). Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with coronary artery disease in Japanese patients with coronary risk factors. Arterioscler Thromb Vasc Biol, **22** (10): 1680-1685.

Kankuri E, Vaali K, Knowles RG, Lahde M, Korpela R, Vapaatalo H and Moilanen E (2001). Suppression of acute experimental colitis by a highly selective inducible nitric-oxide synthase inhibitor, N-[3-(aminomethyl)benzyl]acetamidine. J Pharmacol Exp Ther, **298** (3): 1128-1132.

Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K and Kaper JB (2003). Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. J Clin Microbiol, **41** (11): 4930-4940.

Karmali MA, Steele BT, Petric M and Lim C (1983). Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. Lancet, **1** (8325): 619-620.

Karupiah G, Xie QW, Buller RM, Nathan C, Duarte C and MacMicking JD (1993). Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. Science, **261** (5127): 1445-1448.

Keepers TR, Psotka MA, Gross LK and Obrig TG (2006). A murine model of HUS: Shiga toxin with lipopolysaccharide mimics the renal damage and physiologic response of human disease. J Am Soc Nephrol, **17** (12): 3404-3414.

Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, Pettersson S and Conway S (2004). Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. Nat Immunol, **5** (1): 104-112.

Kenny B and Finlay B (1997). Intimin-dependent binding of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells triggers novel signaling events, including tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma1. Infect. Immun., **65** (7): 2528-2536.

Kerneis S, Bernet MF, Coconnier MH and Servin AL (1994). Adhesion of human enterotoxigenic *Escherichia coli* to human mucus secreting HT-29 cell subpopulations in culture. Gut, **35** (10): 1449-1454.

Kerneis S, Bogdanova A, Colucci-Guyon E, Kraehenbuhl JP and Pringault E (1996). Cytosolic distribution of villin in M cells from mouse Peyer's patches correlates with the absence of a brush border. Gastroenterology, **110** (2): 515-521.

Khattri R, Cox T, Yasayko SA and Ramsdell F (2003). An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. Nat Immunol, **4** (4): 337-342.

Kim DW, Lenzen G, Page AL, Legrain P, Sansonetti PJ and Parsot C (2005). The *Shigella flexneri* effector OspG interferes with innate immune responses by targeting ubiquitin-conjugating enzymes. Proc Natl Acad Sci USA, **102** (39): 14046-14051.

Kim IG and Oh TJ (2000). SOS induction of the recA gene by UV-, gamma-irradiation and mitomycin C is mediated by polyamines in *Escherichia coli* K-12. Toxicol Lett, **116** (1-2): 143-149.

Kim SJ, Hwang SG, Shin DY, Kang SS and Chun JS (2002). p38 kinase regulates nitric oxide-induced apoptosis of articular chondrocytes by accumulating p53 via NFkappa B-dependent transcription and stabilization by serine 15 phosphorylation. J Biol Chem, **277** (36): 33501-33508.

Kim SO, Merchant K, Nudelman R, Beyer WF, Jr., Keng T, DeAngelo J, Hausladen A and Stamler JS (2002). OxyR: a molecular code for redox-related signaling. Cell, **109** (3): 383-396.

Kleinert H, Wallerath T, Fritz G, Ihrig-Biedert I, Rodriguez-Pascual F, Geller DA and Forstermann U (1998). Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappa B-signaling pathways. Br J Pharmacol, **125** (1): 193-201.

Koch C, Hertwig S, Lurz R, Appel B and Beutin L (2001). Isolation of a lysogenic bacteriophage carrying the stx(1(OX3)) gene, which is closely associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from sheep and humans. J Clin Microbiol, **39** (11): 3992-3998.

Kodama T, Nagayama K, Yamada K, Ohba Y, Akeda Y and Honda T (1999). Induction of apoptosis in human renal proximal tubular epithelial cells by *Escherichia coli* verocytotoxin 1 *in vitro*. Med Microbiol Immunol, **188** (2): 73-78.

Kokai-Kun JF, Melton-Celsa AR and O'Brien AD (2000). Elastase in intestinal mucus enhances the cytotoxicity of Shiga toxin type 2d. J Biol Chem, **275** (5): 3713-3721.

Kolios G, Brown Z, Robson RL, Robertson DA and Westwick J (1995). Inducible nitric oxide synthase activity and expression in a human colonic epithelial cell line, HT-29. Br J Pharmacol, **116** (7): 2866-2872.

Kolodziejski PJ, Rashid MB and Eissa NT (2003). Intracellular formation of "undisruptable" dimers of inducible nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci USA, **100** (24): 14263-14268.

Konturek PC, Brzozowski T, Sliwowski Z, Pajdo R, Stachura J, Hahn EG and Konturek SJ (1998). Involvement of nitric oxide and prostaglandins in gastroprotection induced by bacterial lipopolysaccharide. Scand J Gastroenterol, **33** (7): 691-700.

Kovacs MJ, Roddy J, Gregoire S, Cameron W, Eidus L and Drouin J (1990). Thrombotic thrombocytopenic purpura following hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. Am J Med, **88** (2): 177-179.

Krappmann D, Hatada EN, Tegethoff S, Li J, Klippel A, Giese K, Baeuerle PA and Scheidereit C (2000). The I kappa B kinase (IKK) complex is tripartite and contains IKK gamma but not IKAP as a regular component. J Biol Chem, **275** (38): 29779-29787.

Kresse AU, Beltrametti F, Muller A, Ebel F and Guzman CA (2000). Characterization of SepL of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J Bacteriol, **182** (22): 6490-6498.

Kresse AU, Rohde M and Guzman CA (1999). The EspD protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells. Infect Immun, **67** (9): 4834-4842.

Kroncke KD, Suschek CV and Kolb-Bachofen V (2000). Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity. Antioxid Redox Signal, **2** (3): 585-605.

Kruidenier L, Kuiper I, van Duijn W, Marklund SL, van Hogezand RA, Lamers CB and Verspaget HW (2003). Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. J Pathol, **201** (1): 7-16.

L

Laaberki MH, Janabi N, Oswald E and Repoila F (2006). Concert of regulators to switch on LEE expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7: Interplay between Ler, GrlA, HNS and RpoS. Int J Med Microbiol, **296** (4-5): 197-210.

Lamine F, Fioramonti J, Bueno L, Nepveu F, Cauquil E, Lobysheva I, Eutamene H and Theodorou V (2004). Nitric oxide released by *Lactobacillus farciminis* improves TNBS-induced colitis in rats. Scand J Gastroenterol, **39** (1): 37-45.

Larche M (2007). Regulatory T cells in allergy and asthma. Chest, **132** (3): 1007-1014.

Laskay T, Wittmann I, Diefenbach A, Rollinghoff M and Solbach W (1997). Control of *Leishmania major* infection in BALB/c mice by inhibition of early lymphocyte entry into peripheral lymph nodes. J Immunol, **158** (3): 1246-1253.

Lee J, Jayaraman A and Wood T (2007). Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. BMC Microbiology, **7** (1): 42.

Lee TS and Chau LY (2002). Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. Nat Med, **8** (3): 240-246.

Lepoivre M, Chenais B, Yapo A, Lemaire G, Thelander L and Tenu JP (1990). Alterations of ribonucleotide reductase activity following induction of the nitrite-generating pathway in adenocarcinoma cells. J Biol Chem, **265** (24): 14143-14149.

Levine MM, Bergquist EJ, Nalin DR, Waterman DH, Hornick RB, Young CR and Sotman S (1978). *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. Lancet, **1** (8074): 1119-1122.

Li J, Billiar TR, Talanian RV and Kim YM (1997). Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. Biochem Biophys Res Commun, **240** (2): 419-424.

Li P, Elrayess MA, Gomma AH, Palmen J, Hawe E, Fox KM and Humphries DE (2005). The microsatellite polymorphism of heme oxygenase-1 is associated with baseline plasma IL-6 level but not with restenosis after coronary in-stenting. Chin Med J, **118** (18): 1525-32.

Lievin-Le Moal V and Servin AL (2006). The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. Clin Microbiol Rev, **19** (2): 315-337.

Lin J, Smith M, Chapin K, Baik H, Bennett G and Foster J (1996). Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, **62** (9): 3094-3100.

Lindgren SW, Melton AR and O'Brien AD (1993). Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 clinical isolates in an orally infected mouse model. Infect Immun, **61** (9): 3832-3842.

Lindgren SW, Stojiljkovic I and Heffron F (1996). Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. Proc Natl Acad Sci USA, **93** (9): 4197-4201.

Lipton SA, Gu Z and Nakamura T (2007). Inflammatory mediators leading to protein misfolding and uncompetitive/fast off-rate drug therapy for neurodegenerative disorders. Int Rev Neurobiol, **82**: 1-27.

Litalien C, Proulx F, Mariscalco MM, Robitaille P, Turgeon JP, Orrbine E, Rowe PC, McLaine PN and Seidman E (1999). Circulating inflammatory cytokine levels in hemolytic uremic syndrome. Pediatr Nephrol, **13** (9): 840-845.

Liu H, Hu B, Xu D and Liew FY (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta, and CTLA4. J Immunol, **171** (10): 5012-5017.

Louise CB and Obrig TG (1995). Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. J Infect Dis, **172** (5): 1397-1401.

Luck SN, Bennett-Wood V, Poon R, Robins-Browne RM and Hartland EL (2005). Invasion of epithelial cells by locus of enterocyte effacement-negative enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect. Immun., **73** (5): 3063-3071.

M

Ma Z, Gong S, Richard H, Tucker DL, Conway T and Foster JW (2003). GadE (YhiE) activates glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Escherichia coli* K-12. Mol Microbiol, **49** (5): 1309-1320.

Macpherson AJ, Lamarre A, McCoy K, Harriman GR, Odermatt B, Dougan G, Hengartner H and Zinkernagel RM (2001). IgA production without mu or delta chain expression in developing B cells. Nat Immunol, **2** (7): 625-631.

Maeda H and Akaike T (1998). Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. Biochemistry (Mosc), **63** (7): 854-865.

Majlessi N, Choopani S, Bozorgmehr T and Azizi Z (2008). Involvement of hippocampal nitric oxide in spatial learning in the rat. Neurobiol Learn Mem, **90** (2): 413-419.

Maki DG (2006). Don't eat the spinach--controlling foodborne infectious disease. N Engl J Med, **355** (19): 1952-1955.

Malladi V, Puthenedam M, Williams PH and Balakrishnan A (2004). Enteropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteins induce iNOS by activation of NF-kappa B and MAP kinases. Inflammation, **28** (6): 345-353.

Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR and Weaver CT (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. Nature, **441** (7090): 231-234.

Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ and Stamler JS (1999). Fas-induced caspase denitrosylation. Science, **284** (5414): 651-654.

Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, Dolin B, Goodman N, Groden C, Hornung RL, Quezado M, Yang Z, Neurath MF, Salfeld J, Veldman GM, Schwertschlag U and Strober W (2004). Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. N Engl J Med, **351** (20): 2069-2079.

Manzoni O, Prezeau L, Marin P, Deshager S, Bockaert J and Fagni L (1992). Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. Neuron, **8** (4): 653-662.

Marcinkiewicz J (1997). Nitric oxide and antimicrobial activity of reactive oxygen intermediates. Immunopharmacology, **37** (1): 35-41.

Maresca M, Miller D, Quitard S, Dean P and Kenny B (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector-mediated suppression of antimicrobial nitric oxide production in a small intestinal epithelial model system. Cell Microbiol, **7** (12): 1749-1762.

Marion R, Coeffier M, Leplingard A, Favennec L, Ducrotte P and Dechelotte P (2003). Cytokine-stimulated nitric oxide production and inducible NO-synthase mRNA level in human intestinal cells: lack of modulation by glutamine. Clin Nutr, **22** (6): 523-528.

Marks-Konczalik J, Chu SC and Moss J (1998). Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor kappa B-binding sites. J Biol Chem, **273** (35): 22201-22208.

Mastroeni P, Vazquez-Torres A, Fang FC, Xu Y, Khan S, Hormaeche CE and Dougan G (2000). Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival *in vivo*. J Exp Med, **192** (2): 237-248.

Masuda N and Church GM (2003). Regulatory network of acid resistance genes in *Escherichia coli*. Mol Microbiol, **48** (3): 699-712.

Mates AK, Sayed AK and Foster JW (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** (7): 2759-2768.

Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M and Duchmann R (2005). Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. Gastroenterology, **128** (7): 1868-1878.

McCollister BD, Bourret TJ, Gill R, Jones-Carson J and Vazquez-Torres A (2005). Repression of SPI2 transcription by nitric oxide-producing, IFN gamma-activated macrophages promotes maturation of Salmonella phagosomes. J Exp Med, **202** (5): 625-635.

McKee ML, Melton-Celsa AR, Moxley RA, Francis DH and O'Brien AD (1995). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to HEp-2 cells. Infect Immun, **63** (9): 3739-3744.

Megias J, Busserolles J and Alcaraz MJ (2007). The carbon monoxide-releasing molecule CORM-2 inhibits the inflammatory response induced by cytokines in Caco-2 cells. Br J Pharmacol, **150** (8): 977-986.

Melino G, Bernassola F, Knight RA, Corasaniti MT, Nistico G and Finazzi-Agro A (1997). S-nitrosylation regulates apoptosis. Nature, **388** (6641): 432-433.

Mellies JL, Elliott SJ, Sperandio V, Donnenberg MS and Kaper JB (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** (2): 296-306.

Mellies JL, Haack KR and Galligan DC (2007). SOS Regulation of the Type III Secretion System of Enteropathogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol, **189** (7): 2863-2872.

Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL and Kadowitz PJ (1981). Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. Blood, **57** (5): 946-955.

Messmer UK, Ankarcrona M, Nicotera P and Brune B (1994). p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. FEBS Lett, **355** (1): 23-26.

Meyer F, Ramanujam KS, Gobert AP, James SP and Wilson KT (2003). Cutting edge: cyclooxygenase-2 activation suppresses Th1 polarization in response to Helicobacter pylori. J Immunol, **171** (8): 3913-3917.

Michino H, Araki K, Minami S, Takaya S, Sakai N, Miyazaki M, Ono A and Yanagawa H (1999). Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. Am J Epidemiol, **150** (8): 787-796.

Miron M, Woody OZ, Marcil A, Murie C, Sladek R and Nadon R (2006). A methodology for global validation of microarray experiments. BMC Bioinformatics, **7**: 333.

Mnaimneh S, Geffard M, Veyret B and Vincendeau P (1997). Albumin nitrosylated by activated macrophages possesses antiparasitic effects neutralized by anti-NO-acetylated-cysteine antibodies. J Immunol, **158** (1): 308-314.

Mohr S, Stamler JS and Brune B (1996). Posttranslational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment. J Biol Chem, **271** (8): 4209-4214.

Montenegro MA, Bulte M, Trumpf T, Aleksic S, Reuter G, Bulling E and Helmuth R (1990). Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle. J Clin Microbiol, **28** (6): 1417-1421.

Moreau MC and Corthier G (1988). Effect of the gastrointestinal microflora on induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in C3H/HeJ mice. Infect Immun, **56** (10): 2766-2768.

Morgan ME, Sutmuller RP, Witteveen HJ, van Duivenvoorde LM, Zanelli E, Melief CJ, Snijders A, Offringa R, de Vries RR and Toes RE (2003). CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum, **48** (5): 1452-1460.

Morinaga N, Yahiro K, Matsuura G, Watanabe M, Nomura F, Moss J and Noda M (2007). Two Distinct Cytotoxic Activities of Subtilase Cytotoxin Produced by Shiga-Toxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun, **75** (1): 488-496.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA and Coffman RL (2005). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol, **175** (1): 5-14.

Mottet C, Uhlig HH and Powrie F (2003). Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. J Immunol, **170** (8): 3939-3943.

Mukhopadhyay P, Zheng M, Bedzyk LA, LaRossa RA and Storz G (2004). Prominent roles of the NorR and Fur regulators in the *Escherichia coli* transcriptional response to reactive nitrogen species. Proc Natl Acad Sci USA, **101** (3): 745-750.

Mundy R, Petrovska L, Smollett K, Simpson N, Wilson RK, Yu J, Tu X, Rosenshine I, Clare S, Dougan G and Frankel G (2004). Identification of a novel *Citrobacter rodentium* type III secreted protein, EspI, and roles of this and other secreted proteins in infection. Infect Immun, **72** (4): 2288-2302.

Muniesa M and Jofre J (1998). Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the Shiga toxin 2 gene. Appl Environ Microbiol, **64** (7): 2443-2448.

Murata A, Shimazu T, Yamamoto T, Taenaka N, Nagayama K, Honda T, Sugimoto H, Monden M, Matsuura N and Okada S (1998). Profiles of circulating inflammatory- and anti-inflammatory cytokines in patients with hemolytic uremic syndrome due to *E. coli* O157 infection. Cytokine, **10** (7): 544-548.

Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD and Cua DJ (2003). Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. J Exp Med, **198** (12): 1951-1957.

N

Nakahira K, Kim HP, Geng XH, Nakao A, Wang X, Murase N, Drain PF, Wang X, Sasidhar M, Nabel EG, Takahashi T, Lukacs NW, Ryter SW, Morita K and Choi AM (2006). Carbon monoxide differentially inhibits TLR signaling pathways by regulating ROS-induced trafficking of TLRs to lipid rafts. J Exp Med, **203** (10): 2377-2389.

Nakajima H, Kiyokawa N, Katagiri YU, Taguchi T, Suzuki T, Sekino T, Mimori K, Ebata T, Saito M, Nakao H, Takeda T and Fujimoto J (2001). Kinetic analysis of binding between Shiga toxin and receptor glycolipid Gb3Cer by surface plasmon resonance. J Biol Chem, **276** (46): 42915-42922.

Nataro JP and Kaper JB (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, **11** (1): 142-201.

Naylor SW, Roe AJ, Nart P, Spears K, Smith DG, Low JC and Gally DL (2005). *Escherichia coli* O157 : H7 forms attaching and effacing lesions at the terminal rectum of cattle and colonization requires the LEE4 operon. Microbiology, **151** (Pt 8): 2773-2781.

Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V, Rao AS and Madara JL (2000). Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I kappa B-alpha ubiquitination. Science, **289** (5484): 1560-1563.

Neves BC, Knutton S, Trabulsi LR, Sperandio V, Kaper JB, Dougan G and Frankel G (1998). Molecular and ultrastructural characterisation of EspA from different enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes. FEMS Microbiol Lett, **169** (1): 73-80.

Nishikawa K, Watanabe M, Kita E, Igai K, Omata K, Yaffe MB and 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** (14): 2597-2599.

O

O'Brien A, Newland J, Miller S, Holmes R, Smith H and Formal S (1984). Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. Science, **226** (4675): 694-696.

O'Brien AD and Holmes RK (1987). Shiga and Shiga-like toxins. Microbiol Rev, **51** (2): 206-220.

O'Brien AD and LaVeck GD (1983). Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. Infect Immun, **40** (2): 675-683.

O'Brien AD, LaVeck GD, Thompson MR and Formal SB (1982). Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. J Infect Dis, **146** (6): 763-769.

O'Brien AD, Lively TA, Chang TW and Gorbach SL (1983). Purification of *Shigella dysenteriae 1* (Shiga)-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis. Lancet, **2** (8349): 573.

Oelschlaeger TA, Barrett TJ and Kopecko DJ (1994). Some structures and processes of human epithelial cells involved in uptake of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains. Infect Immun, **62** (11): 5142-5150.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G and Cho JH (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature, **411** (6837): 603-606.

Oh TJ and Kim IG (1999). The expression of *Escherichia coli* SOS genes *recA* and *uvrA* is inducible by polyamines. Biochem Biophys Res Commun, **264** (2): 584-589.

Ohara T, Kojio S, Taneike I, Nakagawa S, Gondaira F, Tamura Y, Gejyo F, Zhang HM and Yamamoto T (2002). Effects of azithromycin on shiga toxin production by *Escherichia coli* and subsequent host inflammatory response. Antimicrob Agents Chemother, **46** (11): 3478-3483.

Ostendorf T, Van Roeyen C, Westenfeld R, Gawlik A, Kitahara M, De Heer E, Kerjaschki D, Floege J and Ketteler M (2004). Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide promotes glomerular angiogenesis via upregulation of vascular endothelial growth factor receptors. J Am Soc Nephrol, **15** (9): 2307-19.

Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA and Choi AM (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. Nat Med, **6** (4): 422-428.

Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, Bhattacharya D, Murphy TL, Sha WC and Murphy KM (1998). Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. Immunity, **9** (5): 745-755.

Overhaus M, Moore BA, Barbato JE, Behrendt FF, Doering JG and Bauer AJ (2006). Biliverdin protects against polymicrobial sepsis by modulating inflammatory mediators. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, **290** (4): G695-703.

P

Palmer LE, Hobbie S, Galan JE and Bliska JB (1998). YopJ of *Yersinia pseudotuberculosi*s is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. Mol Microbiol, **27** (5): 953-965.

Paton A, Bourne A, Manning P and Paton J (1995). Comparative toxicity and virulence of *Escherichia coli* clones expressing variant and chimeric Shiga-like toxin type II operons. Infect Immun, **63** (7): 2450-2458.

Paton AW, Beutin L and Paton JC (1995). Heterogeneity of the amino-acid sequences of *Escherichia coli* shiga-like toxin type-I operons. Gene, **153** (1): 71-74.

Paton AW, Morona R and Paton JC (2000). A new biological agent for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. Nat Med, **6** (3): 265-270.

Paton AW, Paton JC, Goldwater PN, Heuzenroeder MW and Manning PA (1993). Sequence of a variant Shiga-like toxin type-I operon of *Escherichia coli* O111:H-. Gene, **129** (1): 87-92.

Paton AW, Srimanote P, Talbot UM, Wang H and Paton JC (2004). A new family of potent AB5 cytotoxins produced by shiga toxigenic *Escherichia coli.* J Exp Med, **200** (1): 35-46.

Paul G, Bataille F, Obermeier F, Bock J, Klebl F, Strauch U, Lochbaum D, Rummele P, Farkas S, Scholmerich J, Fleck M, Rogler G and Herfarth H (2005). Analysis of intestinal haem-oxygenase-1 (HO-1) in clinical and experimental colitis. Clin Exp Immunol, **140** (3): 547-555.

Pellett S and Welch RA (1996). *Escherichia coli* hemolysin mutants with altered target cell specificity. Infect Immun, **64** (8): 3081-3087.

Perez-Perez GI, Shepherd VL, Morrow JD and Blaser MJ (1995). Activation of human THP-1 cells and rat bone marrow-derived macrophages by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. Infect Immun, **63** (4): 1183-1187.

Peters H, Wang Y, Loof T, Martini S, Kron S, Krämer Sand Neumayer HH (2004). Expression and activity of soluble guanylate cyclase in injury and repair of anti-thy1 glomerulonephritis. Kidney Int, **66** (6): 2224-36.

Philpott DJ, Ackerley CA, Kiliaan AJ, Karmali MA, Perdue MH and Sherman PM (1997). Translocation of verotoxin-1 across T84 monolayers: mechanism of bacterial toxin penetration of epithelium. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, **273** (6): G1349-1358.

Philpott DJ, McKay DM, Mak W, Perdue MH and Sherman PM (1998). Signal transduction pathways involved in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced alterations in T84 epithelial permeability. Infect Immun, **66** (4): 1680-1687.

Plunkett Gr, Rose DJ, Durfee TJ and Blattner FR (1999). Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. J Bacteriol, **181** (6): 1767-1778.

Poss KD and Tonegawa S (1997). Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. Proc Natl Acad Sci USA, **94** (20): 10919-10924.

Poss KD and Tonegawa S (1997). Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. Proc Natl Acad Sci USA, **94** (20): 10925-10930.

Powrie F and Coffman RL (1993). Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention. Immunol Today, **14** (6): 270-274.

Price SB, Cheng C-M, Kaspar CW, Wright JC, DeGraves FJ, Penfound TA, Castanie-Cornet M-P and Foster JW (2000). Role of *rpoS* in acid resistance and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7. Appl Environ Microbiol, **66** (2): 632-637.

Proulx F, Turgeon JP, Litalien C, Mariscalco MM, Robitaille P and Seidman E (1998). Inflammatory mediators in *Escherichia coli* O157:H7 hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome. Pediatr Infect Dis J, **17** (10): 899-904.

Pullan ST, Gidley MD, Jones RA, Barrett J, Stevanin TM, Read RC, Green J and Poole RK (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** (5): 1845-1855.

Q

Quelle FW, Thierfelder W, Witthuhn BA, Tang B, Cohen S and Ihle JN (1995). Phosphorylation and activation of the DNA binding activity of purified Stat1 by the Janus protein-tyrosine kinases and the epidermal growth factor receptor. J Biol Chem, **270** (35): 20775-20780.

R

Raghavan S, Fredriksson M, Svennerholm AM, Holmgren J and Suri-Payer E (2003). Absence of CD4+CD25+ regulatory T cells is associated with a loss of regulation leading to increased pathology in *Helicobacter pylori*-infected mice. Clin Exp Immunol, **132** (3): 393-400.

Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM and Swerdlow DL (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. Emerg Infect Dis, **11** (4): 603-609.

Reading NC, Torres AG, Kendall MM, Hughes DT, Yamamoto K and Sperandio V (2007). A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin. J Bacteriol, **189** (6): 2468-2476.

Resta-Lenert S and Barrett KE (2002). Enteroinvasive bacteria alter barrier and transport properties of human intestinal epithelium: role of iNOS and COX-2. Gastroenterology, **122** (4): 1070-1087.

Reynolds JD, Ahearn GS, Angelo M, Zhang J, Cobb F and Stamler JS (2007). S-nitrosohemoglobin deficiency: a mechanism for loss of physiological activity in banked blood. Proc Natl Acad Sci USA, **104** (43): 17058-17062.

Rietra PJ, Willshaw GA, Smith HR, Field AM, Scotland SM and Rowe B (1989). Comparison of Vero-cytotoxin-encoding phages from *Escherichia coli* of human and bovine origin. J Gen Microbiol, **135** (8): 2307-2318.

Ritchie JM, Wagner PL, Acheson DW and Waldor MK (2003). Comparison of Shiga toxin production by hemolytic-uremic syndrome-associated and bovine-associated Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. Appl Environ Microbiol, **69** (2): 1059-1066.

Roach JP, Moore EE, Patrick DA, Damle SS, Silliman CC, McIntyre RC Jr and Banerjee A (2008). Hème oxygenase 1 induction in macrophages by a hemoglobin-based oxygen carrier reduces endotoxin-stimulated cytokine secretion. Shock.

Robert C, Chassard C, Lawson PA and Bernalier-Donadille A (2007). *Bacteroides cellulosilyticus sp. nov.*, a cellulolytic bacterium from the human gut microbial community. Int J Syst Evol Microbiol, **57** (Pt 7): 1516-1520.

Robinson CM, Sinclair JF, Smith MJ and O'Brien AD (2006). Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. Proc Natl Acad Sci USA, **103** (25): 9667-9672.

Robinson CM, Sinclair JF, Smith MJ and O'Brien AD (2006). Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. Proc Natl Acad Sci USA, **103** (25): 9667-9672.

Rodionov DA, Dubchak IL, Arkin AP, Alm EJ and Gelfand MS (2005). Dissimilatory metabolism of nitrogen oxides in bacteria: comparative reconstruction of transcriptional networks. PLoS Comput Biol, **1** (5): e55.

Rogers TJ, Paton AW, McColl SR and Paton JC (2003). Enhanced CXC chemokine responses of human colonic epithelial cells to locus of enterocyte effacement-negative shiga-toxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun., **71** (10): 5623-5632.

Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, Kuhbacher T, Waetzig GH, Seegert D and Schreiber S (2003). TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. Gastroenterology, **124** (4): 1001-1009.

Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, Treuting P, Siewe L, Roers A, Henderson WR, Jr., Muller W and Rudensky AY (2008). Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. Immunity, **28** (4): 546-558.

Russell RM, Sharp FC, Rasko DA and Sperandio V (2007). QseA and GrlR/GrlA regulation of the locus of enterocyte effacement genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J Bacteriol, **189** (14): 5387-5392.

Ryter SW, Alam J and Choi AM (2006). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. Physiol Rev, **86** (2): 583-650.

S

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M and Toda M (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol, **155** (3): 1151-1164.

Salas A, Gironella M, Soriano A, Sans M, Iovanna J, Pique JM and Panes J (2002). Nitric oxide supplementation ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. Lab Invest, **82** (5): 597-607.

Salvemini D, de Nucci G, Gryglewski RJ and Vane JR (1989). Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. Proc Natl Acad Sci USA, **86** (16): 6328-6332.

Salzman AL, Eaves-Pyles T, Linn SC, Denenberg AG and Szabo C (1998). Bacterial induction of inducible nitric oxide synthase in cultured human intestinal epithelial cells. Gastroenterology, **114** (1): 93-102.

Sandborn WJ and Loftus EV (2004). Balancing the risks and benefits of infliximab in the treatment of inflammatory bowel disease. Gut, **53** (6): 780-782.

Sansonetti PJ, Ryter A, Clerc P, Maurelli AT and Mounier J (1986). Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. Infect Immun, **51** (2): 461-469.

Sasaki S, Omoe K, Tagawa Y, Iwakura Y, Sekikawa K, Shinagawa K and Nakane A (2002). Roles of gamma interferon and tumor necrosis factor-alpha in shiga toxin lethality. Microb Pathog, **33** (1): 43-47.

Saubermann LJ, Nakajima A, Wada K, Zhao S, Terauchi Y, Kadowaki T, Aburatani H, Matsuhashi N, Nagai R and Blumberg RS (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ligands stimulate a Th2 cytokine response and prevent acute colitis. Inflamm Bowel Dis, **8** (5): 330-339.

Savkovic SD, Koutsouris A and Hecht G (1997). Activation of NF-kappa B in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. Am J Physiol Cell Physiol, **273** (4): C1160-1167.

Savkovic SD, Koutsouris A and Hecht G (2003). PKC zeta participates in activation of inflammatory response induced by enteropathogenic *E. coli*. Am J Physiol Cell Physiol, **285** (3): C512-521.

Sawa T and Ohshima H (2006). Nitrative DNA damage in inflammation and its possible role in carcinogenesis. Nitric Oxide, **14** (2): 91-100.

Sayed AK, Odom C and Foster JW (2007). The *Escherichia coli* AraC-family regulators GadX and GadW activate *gadE*, the central activator of glutamate-dependent acid resistance. Microbiology, **153** (Pt 8): 2584-2592.

Schapiro JM, Libby SJ and Fang FC (2003). Inhibition of bacterial DNA replication by zinc mobilization during nitrosative stress. Proc Natl Acad Sci USA, **100** (14): 8496-8501.

Schmidt H, Maier E, Karch H and Benz R (1996). Pore-forming properties of the plasmid-encoded hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Eur J Biochem, **241** (2): 594-601.

Schneemann M, Schoedon G, Hofer S, Blau N, Guerrero L and Schaffner A (1993). Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. J Infect Dis, **167** (6): 1358-1363.

Schuller S, Frankel G and Phillips AD (2004). Interaction of Shiga toxin from *Escherichia coli* with human intestinal epithelial cell lines and explants: Stx2 induces epithelial damage in organ culture. Cell Microbiol, **6** (3): 289-301.

Scotland SM, Smith HR, Willshaw GA and Rowe B (1983). Vero cytotoxin production in strain of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage. Lancet, **2** (8343): 216.

Sebbane F, Lemaitre N, Sturdevant DE, Rebeil R, Virtaneva K, Porcella SF and Hinnebusch BJ (2006). Adaptive response of *Yersinia pestis* to extracellular effectors of innate immunity during bubonic plague. Proc Natl Acad Sci USA, **103** (31): 11766-11771.

Sekiya K, Ohishi M, Ogino T, Tamano K, Sasakawa C and Abe A (2001). Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. Proc Natl Acad Sci USA, **98** (20): 11638-11643.

Sharma VK and Zuerner RL (2004). Role of *hha* and *ler* in transcriptional regulation of the *esp* operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J Bacteriol, **186** (21): 7290-7301.

Sharp FC and Sperandio V (2007). QseA directly activates transcription of LEE1 in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect Immun, **75** (5): 2432-2440.

Sheoran AS, Chapman-Bonofiglio S, Harvey BR, Mukherjee J, Georgiou G, Donohue-Rolfe A and 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** (8): 4607-4613.

Sherman PM and Soni R (1988). Adherence of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* of serotype O157:H7 to human epithelial cells in tissue culture: role of outer membranes as bacterial adhesins. J Med Microbiol, **26** (1): 11-17.

Shi Q, Feng J, Qu H and Cheng YY (2008). A proteomic study of S-nitrosylation in the rat cardiac proteins *in vitro*. Biol Pharm Bull, **31** (8): 1536-1540.

Shifflett DE, Clayburgh DR, Koutsouris A, Turner JR and Hecht GA (2005). Enteropathogenic *E. coli* disrupts tight junction barrier function and structure *in vivo*. Lab Invest, **85** (10): 1308-1324.

Shin S, Castanie-Cornet MP, Foster JW, Crawford JA, Brinkley C and Kaper JB (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** (5): 1133-1150.

Shinkai K, Mohrs M and Locksley RM (2002). Helper T cells regulate type-2 innate immunity *in vivo*. Nature, **420** (6917): 825-829.

Siegel MD, Zhang DH, Ray P and Ray A (1995). Activation of the interleukin-5 promoter by cAMP in murine EL-4 cells requires the GATA-3 and CLE0 elements. J Biol Chem, **270** (41): 24548-24555.

Simmons CP, Clare S, Ghaem-Maghami M, Uren TK, Rankin J, Huett A, Goldin R, Lewis DJ, MacDonald TT, Strugnell RA, Frankel G and Dougan G (2003). Central role for B lymphocytes and CD4+ T cells in immunity to infection by the attaching and effacing pathogen *Citrobacter rodentium*. Infect Immun, **71** (9): 5077-5086.

Sinclair JF, Dean-Nystrom EA and O'Brien AD (2006). The established intimin receptor Tir and the putative eucaryotic intimin receptors nucleolin and {beta}1 integrin localize at or near the site of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence to enterocytes *in vivo*. Infect Immun, **74** (2): 1255-1265.

Singh K, Balligand JL, Fischer TA, Smith TW and Kelly RA (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** (2): 1111-1117.

Smith WE, Kane AV, Campbell ST, Acheson DW, Cochran BH and Thorpe CM (2003). Shiga toxin 1 triggers a ribotoxic stress response leading to p38 and JNK activation and induction of apoptosis in intestinal epithelial cells. Infect Immun, **71** (3): 1497-1504.

Soderstrom A, Lindberg A and Andersson Y (2005). EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August-September 2005. Euro Surveill, **10** (9): E050922.050921.

Soloaga A, Veiga MP, Garcia-Segura LM, Ostolaza H, Brasseur R and Goni FM (1999). Insertion of *Escherichia coli*-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. Mol Microbiol, **31** (4): 1013-1024.

Soum E and Drapier JC (2003). Nitric oxide and peroxynitrite promote complete disruption of the [4Fe-4S] cluster of recombinant human iron regulatory protein 1. J Biol Inorg Chem, **8** (1-2): 226-232.

Spek EJ, Wright TL, Stitt MS, Taghizadeh NR, Tannenbaum SR, Marinus MG and Engelward BP (2001). Recombinational repair is critical for survival of *Escherichia coli* exposed to nitric oxide. J Bacteriol, **183** (1): 131-138.

Stempelj M, Kedinger M, Augenlicht L and 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** (13): 9797-9804.

Stim-Herndon KP, Flores TM and Bennett GN (1996). Molecular characterization of *adiY*, a regulatory gene which affects expression of the biodegradative acid-induced arginine decarboxylase gene (*adiA*) of *Escherichia coli*. Microbiology, **142 (Pt 5)**: 1311-1320.

Strauch UG, Obermeier F, Grunwald N, Gurster S, Dunger N, Schultz M, Griese DP, Mahler M, Scholmerich J and Rath HC (2005). Influence of intestinal bacteria on induction of regulatory T cells: lessons from a transfer model of colitis. Gut, **54** (11): 1546-1552.

Strockbine NA, Jackson MP, Sung LM, Holmes RK and O'Brien AD (1988). Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. J Bacteriol, **170** (3): 1116-1122.

Strockbine NA, Marques LR, Newland JW, Smith HW, Holmes RK and O'Brien AD (1986). Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. Infect Immun, **53** (1): 135-140.

Stuehr DJ and Nathan CF (1989). Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. J Exp Med, **169** (5): 1543-1555.

Sung LM, Jackson MP, O'Brien AD and Holmes RK (1990). Transcription of the Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variant operons of *Escherichia coli*. J Bacteriol, **172** (11): 6386-6395.

Sutton MD, Smith BT, Godoy VG and Walker GC (2000). The SOS response: recent insights into *umuDC*-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance. Annu Rev Genet, **34**: 479-497.

Svensson L, Mohlin C and Persson K (2008). Upregulation of heme oxygenase-1 as a host mechanism for protection against nitric oxide-induced damage in human renal epithelial cells. Urology.

Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG and Glimcher LH (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. Cell, **100** (6): 655-669.

Szebeni B, Veres G, Dezsofi A, Rusai K, Vannay A, Mraz M, Majorova E and Arato A (2008). Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. Clin Exp Immunol, **151** (1): 34-41.

T

Tada T, Takemori T, Okumura K, Nonaka M and Tokuhisa T (1978). Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia- and Ia+ helper T cells. J Exp Med, **147** (2): 446-458.

Taguchi H, Takahashi M, Yamaguchi H, Osaki T, Komatsu A, Fujioka Y and Kamiya S (2002). Experimental infection of germ-free mice with hyper-toxigenic enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, strain 6. J Med Microbiol, **51** (4): 336-343.

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.

Tatsuno I, Nagano K, Taguchi K, Rong L, Mori H and Sasakawa C (2003). Increased adherence to Caco-2 cells caused by disruption of the yhiE and yhiF genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun, **71** (5): 2598-2606.

Taylor BS, de Vera ME, Ganster RW, Wang Q, Shapiro RA, Morris SM, Jr., Billiar TR and Geller DA (1998). Multiple NF-kappa B enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. J Biol Chem, **273** (24): 15148-15156.

Trachtman H (2004). Nitric oxide and glomerulonephritis. Sem Nephrol, **24** (4): 324-32.

Te Loo D, M. MW, Monnens LAH, van der Velden TJAM, Vermeer MA, Preyers F, Demacker PNM, van den Heuvel LPWJ and van Hinsbergh VWM (2000). Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. Blood, **95** (11): 3396-3402.

Tesh VL, Burris JA, Owens JW, Gordon VM, Wadolkowski EA, O'Brien AD and Samuel JE (1993). Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. Infect Immun, **61** (8): 3392-3402.

Thorpe CM, Smith WE, Hurley BP and Acheson DW (2001). Shiga toxins induce, superinduce, and stabilize a variety of C-X-C chemokine mRNAs in intestinal epithelial cells, resulting in increased chemokine expression. Infect Immun, **69** (10): 6140-6147.

Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJ, John S and Taams LS (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. Proc Natl Acad Sci USA, **104** (49): 19446-19451.

Tilden JJ, Young W, McNamara AM, Custer C, Boesel B, Lambert-Fair MA, Majkowski J, Vugia D, Werner SB, Hollingsworth J and Morris JGJ (1996). A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. Am J Public Health, **86** (8): 1142-1145.

Trachtman H and Christen E (1999). Pathogenesis, treatment, and therapeutic trials in hemolytic uremic syndrome. Curr Opin Pediatr, **11** (2): 162-168.

Tramonti A, De Canio M, Delany I, Scarlato V and De Biase D (2006). Mechanisms of transcription activation exerted by GadX and GadW at the *gadA* and *gadBC* gene promoters of the glutamate-based acid resistance system in *Escherichia coli*. J Bacteriol, **188** (23): 8118-8127.

Travassos LH, Girardin SE, Philpott DJ, Blanot D, Nahori MA, Werts C and Boneca IG (2004). Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur *via* peptidoglycan recognition. EMBO Rep, **5** (10): 1000-1006.

Trinchieri G (1995). The two faces of interleukin 12: a pro-inflammatory cytokine and a key immunoregulatory molecule produced by antigen-presenting cells. Ciba Found Symp, **195**: 203-214; 214-220.

Tzipori S, Gunzer F, Donnenberg MS, de Montigny L, Kaper JB and Donohue-Rolfe A (1995). The role of the *eaeA* gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. Infect Immun, **63** (9): 3621-3627.

U

Umanski T, Rosenshine I and Friedberg D (2002). Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. Microbiology, **148** (Pt 9): 2735-2744.

V

Vallance BA, Deng W, De Grado M, Chan C, Jacobson K and Finlay BB (2002). Modulation of inducible nitric oxide synthase expression by the attaching and effacing bacterial pathogen *Citrobacter rodentium* in infected mice. Infect Immun, **70** (11): 6424-6435.

Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Memet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ and Ferrero RL (2004). Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. Nat Immunol, **5** (11): 1166-1174.

Vouldoukis I, Riveros-Moreno V, Dugas B, Ouaaz F, Becherel P, Debre P, Moncada S and Mossalayi MD (1995). The killing of Leishmania major by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen. Proc Natl Acad Sci U S A, **92** (17): 7804-7808.

W

Wadolkowski EA, Sung LM, Burris JA, Samuel JE and O'Brien AD (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** (12): 3959-3965.

Wagner PL, Acheson DW and Waldor MK (2001). Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect Immun, **69** (3): 1934-1937.

Wainwright LA and Kaper JB (1998). EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol Microbiol, **27** (6): 1247-1260.

Wang D, Roe AJ, McAteer S, Shipston MJ and Gally DL (2008). Hierarchal type III secretion of translocators and effectors from *Escherichia coli* O157:H7 requires the carboxy terminus of SepL that binds to Tir. Mol Microbiol **69** (6): 1499-1512.

Wang WP, Guo X, Koo MW, Wong BC, Lam SK, Ye YN and Cho CH (2001). Protective role of heme oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, **281** (2): G586-594.

Wei D, Richardson EL, Zhu K, Wang L, Le X, He Y, Huang S and Xie K (2003). Direct demonstration of negative regulation of tumor growth and metastasis by host-inducible nitric oxide synthase. Cancer Res, **63** (14): 3855-3859.

Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S and Liew FY (1995). Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. Nature, **375** (6530): 408-411.

Weissmann N, Voswinckel R, Tadic A, Hardebusch T, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W and Grimminger F (2000). Nitric oxide (NO)-dependent but not NO-independent guanylate cyclase activation attenuates hypoxic vasoconstriction in rabbit lungs. Am J Respir Cell Mol Biol, **23** (2): 222-227.

Wen SX, Teel LD, Judge NA and O'Brien AD (2006). A plant-based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2. Proc Natl Acad Sci USA, **103** (18): 7082-7087.

Westenfeld R, Gawlik A, de Heer E, Kitaha M, Abou-Rebyeh F, Floege J and Ketteler M (2002). Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase enhances intraglomerular coagulation in chronic anti-Thy1 nephritis. Kidney Int, 61 (3): 834-8.

Westerholt S, Hartung T, Tollens M, Gustrau A, Oberhoffer M, Karch H, Klare B, Pfeffer K, Emmrich P and Oberhoffer R (2000). Inflammatory and immunological parameters in children with haemolytic uremic syndrome (HUS) and gastroenteritis-pathophysiological and diagnostic clues. Cytokine, **12** (6): 822-827.

Westerholt S, Pieper AK, Griebel M, Volk HD, Hartung T and Oberhoffer R (2003). Characterization of the cytokine immune response in children who have experienced an episode of typical hemolytic-uremic syndrome. Clin Diagn Lab Immunol, **10** (6): 1090-1095.

Wieler LH, McDaniel TK, Whittam TS and Kaper JB (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** (1): 49-53.

Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD, Byrne G, McEuen M, Proll S, Appleby M and Brunkow ME (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. Nat Genet, **27** (1): 18-20.

Willshaw GA, Smith HR, Scotland SM, Field AM and Rowe B (1987). Heterogeneity of *Escherichia coli* phages encoding Vero cytotoxins: comparison of cloned sequences determining VT1 and VT2 and development of specific gene probes. J Gen Microbiol, **133** (5): 1309-1317.

Witthoft T, Eckmann L, Kim JM and Kagnoff MF (1998). Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cells. Am J Physiol, **275** (3 Pt 1): G564-571.

Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL and Tarr PI (2000). The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. N Engl J Med, **342** (26): 1930-1936.

Wu J, Ma J, Fan ST, Schlitt HJ and Tsui TY (2005). Bilirubin derived from heme degradation suppresses MHC class II expression in endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun, **338** (2): 890-896.

X

Xie QW, Whisnant R and 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** (6): 1779-1784.

Y

Yamada T and Grisham MB (1991). Role of neutrophil-derived oxidants in the pathogenesis of intestinal inflammation. Klin Wochenschr, **69** (21-23): 988-994.

Yamagami S, Motoki M, Kimura T, Izumi H, Takeda T, Katsuura Y and 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** (6): 738-742.

Yamamoto M, Takeda K and Akira S (2004). TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. Mol Immunol, **40** (12): 861-868.

Yamasaki C, Natori Y, Zeng XT, Ohmura M, Yamasaki S and Takeda Y (1999). Induction of cytokines in a human colon epithelial cell line by Shiga toxin 1 (Stx1) and Stx2 but not by non-toxic mutant Stx1 which lacks N-glycosidase activity. FEBS Lett, **442** (2-3): 231-234.

Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, Shah B, Chang SH, Schluns KS, Watowich SS, Feng XH, Jetten AM and Dong C (2008). Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. Immunity, **29** (1): 44-56.

Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA and Rennick D (2006). IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. J Clin Invest, **116** (5): 1310-1316.

Young FS and Furano AV (1981). Regulation of the synthesis of *E. coli* elongation factor Tu. Cell, **24** (3): 695-706.

Yu J and Kaper JB (1992). Cloning and characterization of the eae gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Mol Microbiol, **6** (3): 411-417.

Yu QT, Saruta M, Avanesyan A, Fleshner PR, Banham AH and Papadakis KA (2007). Expression and functional characterization of FOXP3+ CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis, **13** (2): 191-199.

Z

Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M and Karin M (1997). The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for I kappaB phosphorylation and NF-kappa B activation. Cell, **91** (2): 243-252.

Zenclussen AC, Sollwedel A, Bertoja AZ, Gerlof K, Zenclussen ML, Woiciechowsky C and Volk HD (2005). Heme oxygenase as a therapeutic target in immunological pregnancy complications. Int Immunopharmacol, **5** (1): 41-51.

Zhang L, Chaudhuri RR, Constantinidou C, Hobman JL, Patel MD, Jones AC, Sarti D, Roe AJ, Vlisidou I, Shaw RK, Falciani F, Stevens MP, Gally DL, Knutton S, Frankel G, Penn CW and Pallen MJ (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** (12): 7282-7293.

Zhang W, Bielaszewska M, Kuczius T and Karch H (2002). Identification, Characterization, and Distribution of a Shiga Toxin 1 Gene Variant (stx1c) in *Escherichia coli* Strains Isolated from Humans. J Clin Microbiol, **40** (4): 1441-1446.

Zhang Y, Brovkovych V, Brovkovych S, Tan F, Lee BS, Sharma T and Skidgel RA (2007). Dynamic receptor-dependent activation of inducible nitric-oxide synthase by ERK-mediated phosphorylation of Ser745. J Biol Chem, **282** (44): 32453-32461.

Zhao T, Doyle MP, Shere J and Garber L (1995). Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. Appl Environ Microbiol, **61** (4): 1290-1293.

Zheng W and Flavell RA (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. Cell, **89** (4): 587-596.

Zhou X, Giron JA, Torres AG, Crawford JA, Negrete E, Vogel SN and Kaper JB (2003). Flagellin of enteropathogenic *Escherichia coli* stimulates interleukin-8 production in T84 cells. Infect Immun, **71** (4): 2120-2129.

Zoetendal EG, Vaughan EE and de Vos WM (2006). A microbial world within us. Mol Microbiol, **59** (6): 1639-1650.

LISTE DES TRAVAUX ET PUBLICATIONS

PUBLICATIONS

De Sablet T, Chassard C, Bernalier-Donadille A, **Vareille M**, Gobert AP and Martin C. Human Microbiota-Secreted Factors Inhibit Shiga-Toxin Synthesis by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. ***En révison dans Infect. Immun***.

Vareille M, Rannou F, Thélier N, Glasser AL, de Sablet T, Martin C and Gobert AP. Heme oxygenase is a critical regulator of NO production in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-infected human entérocytes. ***J. Immunol.*** (2008) 180(8):5720-6.

Gobert AP, Coste A, Guzman CA, **Vareille M**, Hindré T, de Sablet T, Girardeau JP and Martin C. Modulation of chemokine gene expression by Shiga-toxin producing *Escherichia coli* belonging to various origin and serotypes. ***Microbes Infect***. (2008) 10(2):159-65.

de Sablet T, Bertin Y, **Vareille M**, Garrivier A, Girardeau JP, Gobert AP and Martin C. Differential expression of stx_2 alleles in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* belonging to seropathotypes A and C. ***Microbiol.*** (2008) 154(Pt 1):176-86.

Gobert AP, **Vareille M**, Glasser AL, Hindré T, de Sablet T and Martin C. Shiga-toxin produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* inhibits PI3K/NF-κB signaling pathway in globotriaosylceramide-3-negative human intestinal epithelial cells. ***J. Immunol.*** (2007) 178 (12): 8168-8174

Vareille M, de Sablet T, Hindré T, Martin C and Gobert AP. Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*** (2007) 104 (24): 10199-10204.

COMMUNICATIONS

- COMMUNICATIONS ORALES

Vareille M, Airault C, Martin C and Gobert AP. Le monoxyde d'azote représenterait-il un nouveau moyen de lutte contre les infections aux *Escherichia coli* entérohémorragiques?
Journées de l'Ecole doctorale, 2008, Clermont-Ferrand, France.

De Sablet T, Chassard C, Bernalier-Donadille A, **Vareille M**, Gobert AP and Martin C. The human microbiota inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*.
Digestive Disease Week, 2008. San Diego, USA.

Vareille M, Glasser AL, de Sablet T, Martin C and Gobert AP. Les interactions entre le monoxyde d'azote et les *E. coli* entérohémorragiques.
GREMIP, 2007, Université de Montréal, Montréal, Canada.

Vareille M, Rannou F, Thélier N, de Sablet T, Glasser AL, Martin C and Gobert AP. Régulation de l'expression de la iNOS par des bactéries pathogènes : Implication de l'hème oxygénase.
Journée Scientifique du Club NO, 2007, Paris, France.

Vareille M, de Sablet T, Harel J, Crépin S, Martin C, and Gobert AP. Inhibition de la production d'une toxine bactérienne par NO via NsrR.
Journée Scientifique du Club NO, 2007, Paris, France.

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

Vareille M, Glasser AL, de Sablet T, Martin C and Gobert AP. Inhibition of nitric oxide production in human intestinal epithelial cells by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* results in increased Shiga-toxin synthesis.
GREMI, 2007, Institut Pasteur, Paris, France.

Vareille M, de Sablet T, Martin C and Gobert AP. Nitric oxide inhibits Shiga-toxin gene expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*.
Fourth International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 2006, Monterey, USA.

Vareille M, de Sablet T, Durand A, Martin C and Gobert AP. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibit nitric oxide synthesis by activated human intestinal epithelial cells.
Gut Microbiology, 2006, Aberdeen, Ecosse.

Vareille M, de Sablet T, Durand A, Martin C and Gobert AP. Le monoxyde d'azote : un nouvel inhibiteur de la production de Shiga-toxine par les *Escherichia coli* entérohémorragiques.

Journée de L'Institut fédératif de Recherche Santé Auvergne, 2006, Clermont-Ferrand, France.

Vareille M, de Sablet T, Durand A, Martin C and Gobert AP. Inhibition de la production de monoxyde d'azote des cellules épithéliales intestinales humaines par les *Escherichia coli* entérohémorragiques.

IIIème Journée des microbiologistes, 2006, Clermont-Ferrand, France.

Vareille M, de Sablet T, Durand A, Martin C and Gobert AP. Analyse des interactions entre le monoxyde d'azote et les *Escherichia coli* entérohémorragiques.

Journée Scientifique du Club NO, 2006, Paris, France.

- COMMUNICATIONS AFFICHÉES

Vareille M, Airault C, Martin C and Gobert AP. Nitric oxide is a regulator of the locus of enterocyte effacement in Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*.
6th Joint INRA-RRI Symposium on Gut Microbiome, Functionality, Interaction with the Host and Impact on the Environment, 2008, Clermont-Ferrand, France.

De Sablet T, Chassard C, Bernalier-Donadille A, **Vareille M**, Gobert AP and Martin C. The human microbiota inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*.

6th Joint INRA-RRI Symposium on Gut Microbiome, Functionality, Interaction with the Host and Impact on the Environment, 2008, Clermont-Ferrand, France.

De Sablet T, Chassard C, Bernalier-Donadille A, **Vareille M**, Gobert AP and Martin C. The human microbiota inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*.
E. coli: Pathogenicity, Virulence and Emerging Pathogenic Strains Conference. Pathogenic E. coli network, 2008. Rome, Italie.

Vareille M, Rannou F, Thélier N, Glasser AL, de Sablet T, Martin C and Gobert AP. Inhibition de l'expression de la NOS2 par des bactéries pathogènes : Implication de l'hème oxygénase.
Journée de l'Institut Fédératif de Recherche Santé Auvergne, 2007, Clermont-Ferrand, France.

Vareille M, Glasser AL, de Sablet T, Martin C and Gobert AP. Inhibition of nitric oxide production in human intestinal epithelial cells by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* results in increased Shiga-toxin synthesis.
GREMI, 2007, Institut Pasteur, Paris.

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

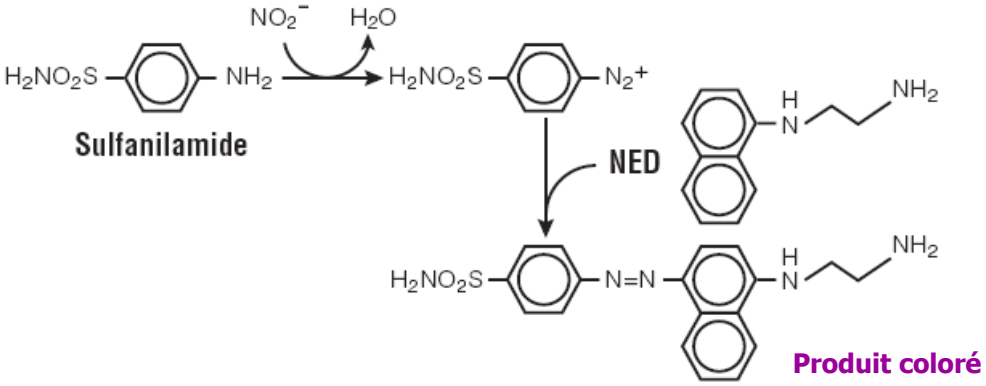
Vareille M., Durand A, de Sablet T, Martin C and Gobert AP**.** (2006). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibit iNOS expression in activated human intestinal epithelial cells.
Fourth International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, *Monterey, USA.*

PRIX SCIENTIFIQUES

- **Bourse "Pour les femmes et la science"** : L'Oréal-Unesco (www.loreal.fr), 2007, Paris, France.
- **Prix de la meilleure communication orale** : Journée de l'institut fédératif de recherche Santé-Auvergne, 2006, Clermont-Ferrand, France.
- **Prix Jeune Chercheur 2006** : Club NO national, 2006, Paris, France.
- **Prix Hot Topic Session** : 4th International Conference of Nitric Oxide Society, 2006, Monterey, USA

ANNEXES

Annexe I : Réaction colorimétrique de Griess



Réactifs de GRIESS :

- Griess A : Sulfanilamide 1 % dilué dans HCl 1,2 N
- Griess B : Naphtylène dimamine dichlorhydrate 0,3 % dilué dans l'eau distillée

Dosage des NO_3^- (Kit Nitrate/Nitrite Assay, Sigma):

A 80 µl de surnageant de culture, on ajoute 10 µl de nitrate réductase et 10 µl de co-facteurs. Le mélange réactionnel est incubé 2 h à température ambiante. A la fin de l'incubation, on ajoute 50 µl de Griess A puis 50 µl de Griess B. La réaction colorimétrique se développe à l'abri de la lumière pendant 10 min. L'absorbance de chaque échantillon est mesurée à 540 nm à l'aide d'un lecteur de plaques µQuant (BioTek Instruments).

Les valeurs sont reportées sur une courbe étalon effectuée à partir de concentrations connues de NO_3^- diluées dans le même milieu : A540= f ([NO_3^-]).

Dosage des NO_2^- :

A 50 µl de surnageant de culture, on ajoute 60 µl de Griess A puis 60 µl de Griess B. La réaction colorimétrique se développe à l'abri de la lumière pendant 10 min. L'absorbance de chaque échantillon est mesurée à 540 nm à l'aide d'un lecteur de plaques µQuant (BioTek Instruments).

Les valeurs sont reportées sur une courbe étalon effectuée à partir de concentrations connues de NO_2^- diluées dans le même milieu : A540= f ([NO_2^-]).

Gamme étalon :

Solution mère de NaNO3 ou NaNO2 à 160 µM
Dilutions successives au ½

Annexe II : Composition milieu Luria Bertani (MLB)

Milieu MLB liquide 20X, composition pour 1l de milieu :

- Bacto peptone (ou Bacto tryptone): 200 g
- NaCl: 100 g
- Extrait de levure 100 g
- Eau distillée 1 l

Ajuster le pH à 7

Annexe III : Extraction d'ARN par la méthode phénol/chloroforme

Extraction des acides nucléiques :

- Reprendre le culot bactérien dans 1 ml de TRIzol
- Vortexer et incuber à température ambiante pendant 10 minutes
- Ajouter 0,2 volume de chloroforme
- Agiter pendant 30 secondes et incuber 10 min à température ambiante
- Centrifuger 15 minutes à 12000 g à 4 °C
- Récupérer la partie aqueuse supérieure et ajouter 0,5 ml d'isopropanol
- Centrifuger 10 minutes à 12000 g à 4 °C
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 1 ml d'éthanol 75%
- Centrifugation 10 minutes, à 7500 g à 4 °C
- Eliminer le surnageant et sécher le culot
- Dissoudre les culots dans 30 µl d'eau DEPC pendant 10 minutes à 56 °C

Traitement à la Dnase :

- Ajouter 10 µl de Dnase I aux échantillons
- Incuber 30 min à 37°C

Dosage des ARN :

- Mesurer la DO à 260 et 280 nm en lecteur de plaque µQuant (BioTek Instruments)
- [ARN] (µg/µl)= (DO_{260} x 40 x facteur de dilution)/1000

Annexe IV: Conditions de PCR quantitative en LightCycler®

→ **Composition du mélange réactionnel pour chaque tube (kit Roche)** :

- $MgCl_2$ 25 mM : 2,4 µl
- amorce 1 10 µM: 1 µl
- amorce 2 10 µM: 1 µl
- eau dépourvue de RNases : 12,6 µl
- SybR Green : 1 µl

Centrifuger pendant 15 secondes, introduire les capillaires dans le LightCycler puis lancer le programme de PCR quantitative :

→ **Programme** :

- **Dénaturation** : →95 °C ; 10 minutes
- **PCR : 45 cycles** : → 95 °C ; 15 secondes
  → x °C ; 5 secondes

	stx2	*sx1*	*recA*	*fliC*	*hmpA*	*vacB*
x	51°C	53°C	58°C	50°C	55°C	55°C

  → 72 °C ; 8 secondes

- **Melting curves** : → 95 °C ; 15 secondes
  → 65 °C ; 5 secondes
- **Refroidissement** : →45 °C ; 30 secondes

Annexe V : Composition des tampons utilisés en ELISA

- Tampon carbonate-bicarbonate :

Na_2CO_3	1,59 g/l
$NaHCO_3$	2,94 g/l
NaN_3	0,2 g
Eau distillée	qsp 1 l

- Solution de saturation:

PBS	1 X
BSA	4 g/l

- Tampon de dilution antigènes et anticorps:

PBS	1 X
BSA	1 g/l

- Tampon de lavage:

PBS	1 X
Tween 20	0,05 % (v/v)

Annexe VI: Composition des tampons utilisés nitrate d'argent

- Solution de fixation :

Ethanol absolu	200 ml
Acide acétique	50 ml
Eau distillée	qsp 500 ml

- Solution de sensibilisation :

Thiosulfate de sodium	0,5 g
Ethanol absolu	75 ml
Acétate de sodium	17 g
Eau distillée	175 ml

- Solution de coloration :

Nitrate d'argent	0,62 g
Eau distillée	qsp 250 ml

- Solution de révélation :

Carbonate de sodium	6,25 g
Eau distillée	250 ml
Formaldéhyde 37%	100 µl

- Solution d'arrêt :

EDTA	6,25 g
Eau distillée	250 ml

Annexe VII: Conditions de PCR semi-quantitative en Realplex®

→ **Composition du mélange réactionnel pour chaque puit (Kit Takara, Lonza)** :

- amorce JOE 15 µM: 0,6 µl
- amorce FAM 15 µM: 0,15 µl
- SybR Green : 10 µl
- ADNc : 2 µl
- eau dépourvue de RNases qsp 20 µl

→ **Programme** :

- **Dénaturation** : →95 °C ; 2 minutes
- **PCR : 45 cycles** : → 95 °C ; 15 secondes
  → 59 °C ; 30 secondes
  → 72 °C ; 40 secondes
- **Elongation finale** : → 72 °C ; 15 secondes
- **Melting curves** : → 95 °C ; 15 secondes
  → 65 °C ; 5 secondes
- **Refroidissement** : → 45 °C ; 30 secondes

Annexe VIII: Conditions de PCR classique

→ **Composition du mélange réactionnel pour chaque tube** :

- Buffer 10X : 2,5 µl
- MgCl2 : 0,75 µl
- dNTP : 0,5 µl
- amorces h-iNOS ou h-hmox-1 15 µM: 0,25 µl
- amorces h-actine 15 µM: 0,15 µl
- Taq platinum : 0,25 µl
- ADNc : 1 µl
- eau dépourvue de RNases qsp 25 µl

→ **Programme** :

- **Dénaturation** : →95 °C ; 2 minutes
- **PCR : 30 cycles** : → 95 °C ; 1 minutes
  → 58 °C ; 1 minutes
  → 72 °C ; 1 minutes 30 secondes
- **Elongation finale** : → 72 °C ; 5 minutes

Annexe IX: Isolation des ARN par le kit RiboPure™-Bacteria

- Ajouter 350µl de RNAwiz aux culots bactériens
- Vortexer 15 sec et centrifuger 5 min à 4°C
- Récupérer le surnageant et ajouter 0,2 volume de chloroforme
- Vortexer 30 sec et incuber 10 min à température ambiante
- Centrifuger 5min à 4°C
- Récupérer la phase aqueuse et ajouter 70µl d'éthanol 100%
- Vortexer pendant 10 sec et transférer le mélange réactionnel dans une colonne
- Centrifuger 1min-13000 rpm
- Ajouter 700 µl de Wash solution 1 sur la colonne
- Centrifuger 1min 13000 rpm
- Ajouter 500 µl de Wash solution 2/3 sur la colonne
- Centrifuger 1min 13000 rpm
- Ajouter 500 µl de Wash solution 2/3 sur la colonne
- Centrifuger 1min 13000 rpm
- Transférer le filtre dans un nouveau tube de 2ml
- Ajouter 30µl H20 bouillit sur la colonne
- Centrifuger 1min 13000 rpm
- Récupérer l'éluat

Annexe X: Conditions de PCR semi-quantitative en Realplex®

→ **Composition du mélange réactionnel pour chaque puit (Kit Takara, Lonza)** :

- amorce JOE 15 µM: 0,5 µl
- amorce FAM 15 µM: 0,5 µl
- SybR Green : 10 µl
- ADNc : 2 µl
- eau dépourvue de RNases qsp 20 µl

→ **Programme** :

- **Dénaturation** : →95 °C ; 2 minutes
- **PCR : 45 cycles** : → 95 °C ; 15 secondes
  → 60,1 °C * ; 30 secondes
  → 72 °C ; 40 secondes
- **Elongation finale** : → 72 °C ; 15 secondes
- **Melting curves** : → 95 °C ; 15 secondes
  → 65 °C ; 5 secondes
- **Refroidissement** : → 45 °C ; 30 secondes

* *gadE* : 63°C

Annexe XI: Conditions de PCR semi-quantitative en Realplex®

→ **Composition du mélange réactionnel pour chaque puit (Kit Takara, Lonza)** :

- amorce JOE 15 µM: 0,5 µl
- amorce FAM 15 µM: 0,5 µl
- SybR Green : 10 µl
- ADNc : 2 µl
- eau dépourvue de RNases qsp 20 µl

→ **Programme** :

- **Dénaturation** : →95 °C ; 2 minutes
- **PCR : 45 cycles** : → 95 °C ; 15 secondes
  → 59 °C ; 30 secondes
  → 72 °C ; 40 secondes
- **Elongation finale** : → 72 °C ; 15 secondes
- **Melting curves** : → 95 °C ; 15 secondes
  → 65 °C ; 5 secondes
- **Refroidissement** : → 45 °C ; 30 secondes

La réponse immunitaire mucosale intestinale lors de l'infection par les *Escherichia coli* entérohémorragiques : Rôle et régulation de la synthèse de monoxyde d'azote

RÉSUMÉ

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont des bactéries qui colonisent l'intestin de l'homme et produisent des Shiga-toxines (Stx) ; ces dernières sont responsables du développement du syndrome hémolytique et urémique (SHU), la première cause d'insuffisance rénale aiguë chez l'enfant à travers le monde. Nous avons analysés différents aspects des interactions entre les EHEC et le monoxyde d'azote (NO). NO produit par la NO synthase inductible (iNOS) est un médiateur incontournable de la réponse innée chez l'homme. NO est un agent antibactérien, peut induire des modifications transcriptionnelles chez les procaryotes et moduler l'inflammation.

L'objectif de mes travaux de thèse a été d'étudier différents aspects des interactions moléculaires et physiologiques entre NO et les EHEC.

Nous avons démontré que le NO inhibe l'attachement des EHEC aux cellules épithéliales intestinales humaines en réprimant l'expression de gènes du locus d'effacement des entérocytes qui code pour un système de sécrétion de type III *via* le système Gad. Par ailleurs, en agissant sur les senseurs bactériens NorR et NsrR, NO produit par des donneurs chimique de NO ou par des cellules épithéliales humaines activées sensibilise les EHEC et diminue la réponse SOS bactérienne, la transcription du gène *stx* et la production de Stx. En retour, les EHEC induisent l'hème oxygénase-1 (HO-1) dans les cellules épithéliales. Cette enzyme produit du monoxyde de carbone qui interfère avec la voie de signalisation IFN-γ/STAT-1, réprimant ainsi l'expression de la iNOS et la production de NO par les entérocytes activés par les cytokines de type 1. Enfin, des muqueuses coliques de rats axéniques infectés par des EHEC montrent moins d'infiltration de cellules immunes et d'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires et pour la iNOS que des rats infectés par une souche commensale humaine de *E. coli*. En revanche, les EHEC, et non les *E. coli* commensaux, ont stimulé la production de HO-1 dans les côlons des animaux.

Mots clés : EHEC, NO, régulation, Stx2, immunité mucosale, SHU.