



HAL
open science

Régulation par le fer et rôle de la colibactine dans la colonisation du tube digestif par *Escherichia coli*

Sophie Tronnet

► **To cite this version:**

Sophie Tronnet. Régulation par le fer et rôle de la colibactine dans la colonisation du tube digestif par *Escherichia coli*. Microbiologie et Parasitologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30062 . tel-01810856

HAL Id: tel-01810856

<https://theses.hal.science/tel-01810856>

Submitted on 8 Jun 2018

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.



THÈSE

en vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

délivré par :

l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier

présentée et soutenue par :

Sophie TRONNET

le mardi 10 janvier 2017

Titre :

Régulation par le fer et rôle de la colibactine dans la colonisation du tube digestif par *Escherichia coli*

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED Biologie-Santé-Biotechnologies : Microbiologie

Unité de recherche :

Institut de Recherche en Santé Digestive (IRSD)
INSERM UMR1220 – INRA UMR1416 – ENVT – Université Toulouse 3

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr. Patricia MARTIN
Pr. Éric OSWALD

Jury :

Dr. Isabelle Schalk, DR, Strasbourg
Dr. Laurent DEARBIEUX, Dr, Paris
Dr. Patricia MARTIN, Chercheur, Toulouse
Pr. Éric OSWALD, PU-PH, Toulouse

Rapporteur
Rapporteur
Co-directrice de Thèse
Co-directeur de Thèse

Remerciements

Je remercie sincèrement,

Madame le Docteur Isabelle Schalk, rapporteur, d'avoir aimablement accepté de juger ce travail de thèse en tant que rapporteur. Je suis fière de vous compter parmi mes juges et vous assure ma reconnaissance et mon respect.

Monsieur le Docteur Laurent Debarbieux, rapporteur, d'avoir également accepté d'être rapporteur de cette thèse et de participer à ce jury. Veuillez trouver ici la marque de mon plus grand respect.

Madame le Docteur Patricia Martin, co-directrice de thèse, d'avoir accepté d'être ma co-directrice de thèse. Je te remercie chaleureusement pour ton soutien, ta grande disponibilité et tes nombreux conseils, notamment durant la rédaction de cette thèse. Merci aussi pour ta confiance, ton écoute et ta patience. Cela a été un plaisir de travailler sous ta direction. Trouve ici toute ma gratitude et mon respect sincère.

Monsieur le Professeur Éric Oswald, co-directeur de thèse, de m'avoir accueillie dans votre équipe de recherche et d'avoir co-dirigé cette thèse. Merci pour votre confiance, vos conseils, et votre encadrement. Ce fut un plaisir de travailler dans votre équipe et sous votre direction.

Résumé

Le microbiote intestinal joue un rôle majeur dans le développement des fonctions digestive, métabolique, immunitaire et neurologique de son hôte. *Escherichia coli* est un hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'Homme et des animaux à sang chaud, et s'établit dans le tractus digestif dès les premières heures ou jours qui suivent la naissance. L'espèce *E. coli*, bactérie anaérobie facultative prévalente, peut être divisée en sept groupes phylogénétiques principaux. Le groupe phylogénétique B2 comprend le plus grand nombre de souches responsables d'infections extra-intestinales (méningites néonatales, infections urinaires, septicémies, ...) ou chroniques (cancers, maladie de Crohn, ...). Des études épidémiologiques récentes montrent que le portage de ces souches est en augmentation dans les pays industrialisés, au détriment du groupe ancestral A. L'objectif de mon projet de thèse était de déterminer les facteurs à l'origine de cette évolution.

Une analyse génétique montre que les souches du groupe phylogénétique B2 ont développé une très grande capacité à acquérir le fer, notamment via les sidérophores. Les souches appartenant au groupe B2 sont aussi les seules capables de synthétiser une génotoxine, la colibactine. Celle-ci induit des cassures de l'ADN double brin dans les cellules eucaryotes, pouvant être à l'origine de cancers colorectaux ou d'un défaut de développement de la barrière intestinale. Les sidérophores et la colibactine appartiennent à la même famille de molécules, *i.e.* des hybrides polycétide-peptide non ribosomiaux. Leur biosynthèse fait intervenir des enzymes multifonctionnelles qui doivent être activées par fixation covalente d'un groupement 4'-phosphopantéthéïnyl (P-pant). Cette modification post-traductionnelle est catalysée par la 4'-phosphopantéthéïnyl transférase (PPTase). La PPTase ClbA est impliquée dans la synthèse de colibactine. La PPTase impliquée dans celle des sidérophores est EntD.

Récemment, notre équipe a montré que ClbA pouvait participer à la synthèse des sidérophores, et remplacer EntD. Ceci montrait pour la première fois une connexion entre les multiples voies nécessitant des PPTases et conduisant à la biosynthèse de métabolites secondaires fonctionnellement distincts dans un micro-organisme donné.

Dans la mesure où l'expression de *entD* et la synthèse des sidérophores sont régulées par la

disponibilité en fer, nous avons fait l'hypothèse que l'expression de *clbA* et synthèse de la colibactine étaient également régulées par la quantité de fer. Cette étude révèle que la transcription du gène *clbA* et la production de colibactine diminuaient en conditions riches en fer, et que cette régulation se faisait via deux voies : dépendante et indépendante des deux régulateurs majeurs de l'homéostasie du fer chez la bactérie : FUR (Ferric Uptake Regulator), régulateur global de l'homéostasie du fer et RyhB, un petit ARN régulateur. Cette régulation pourrait permettre une production fine des facteurs de virulence que sont les sidérophores et la colibactine, et présenter un avantage dans l'établissement de la colonisation du tractus intestinal.

Le rôle potentiel de la colibactine dans l'établissement de la colonisation intestinale par *E. coli* constitue la seconde partie de mon travail de thèse. L'utilisation d'un modèle murin qui permet de reproduire la transmission naturelle des *E. coli* du microbiote de la mère au nouveau-né, suggère que la colibactine joue un rôle dans la colonisation intestinale.

En conclusion, nous avons mis en évidence que la biosynthèse de la colibactine, et la transcription de *clbA* étaient régulées par le fer, et que la colibactine pourrait favoriser l'établissement de la colonisation intestinale de *E. coli*. Par conséquent, nous faisons l'hypothèse que parmi les facteurs pouvant être à l'origine de l'augmentation de la prévalence des souches du groupe B2 dans les pays industrialisés, le fer alimentaire et l'interaction entre sidérophores et colibactine seraient des facteurs majeurs.

Table des Matières

TABLE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	- 12 -
LISTE DES FIGURES.....	- 15 -
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	- 16 -
CHAPITRE I : LE MICROBIOTE INTESTINAL, NICHE PRIMAIRE DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	- 17 -
1. Le microbiote intestinal.....	- 17 -
1.1. Généralités.....	- 17 -
1.2. Mise en place microbiote.....	- 20 -
1.3. Les facteurs influençant la mise en place du microbiote pendant la période néonatale.....	- 21 -
1.3.1. <i>Le mode d'accouchement</i>	- 22 -
1.3.2. <i>L'alimentation du nouveau-né</i>	- 22 -
1.3.3. <i>Le fer dans l'alimentation</i>	- 23 -
2. <i>E. coli</i> , une bactérie du microbiote intestinal.....	- 25 -
2.1. Généralités.....	- 25 -
2.2. Diversité phylogénétique et plasticité génomique	- 26 -
2.3. Commensalisme de <i>E. coli</i>	- 28 -
2.4. Facteurs impliqués dans la colonisation de <i>E. coli</i>	- 29 -
2.4.1. <i>Capacité à croître dans le mucus</i>	- 29 -
2.4.2. <i>Le métabolisme central</i>	- 30 -
2.4.3. <i>La disponibilité des nutriments et compétition</i>	- 31 -
2.5. Focus sur le groupe phylogénétique B2.....	- 32 -
2.5.1. <i>Généralités</i>	- 32 -
2.5.2. <i>Prévalence du groupe phylogénétique B2</i>	- 33 -
CHAPITRE II : LES MÉTABOLITES SECONDAIRES DE TYPE POLYCÉTIDES ET PEPTIDES NON-RIBOSOMAUX...-	35 -
1. Introduction aux métabolites secondaires.....	- 35 -
2. Synthèse des PK, NRP et hybrides PK-NRP	- 36 -
2.1. Généralités.....	- 36 -
2.2. Organisation des machineries enzymatiques.....	- 36 -
2.2.1. <i>Chaîne d'assemblage des composés NRP</i>	- 37 -
2.2.2. <i>Chaîne d'assemblage des composés PK</i>	- 37 -
2.2.3. <i>Chaîne d'assemblage des hybrides PKS-NRPS</i>	- 37 -
2.3. La logique chimique	- 38 -
2.3.1. <i>Activation des monomères ou initiation</i>	- 38 -
2.3.2. <i>Élongation des oligomères</i>	- 39 -
2.3.3. <i>Modification des oligomères</i>	- 39 -
3. Activation des PKS et NRPS par les Phosphopantéthéinyl transférases.....	- 39 -
3.1. Les domaines porteurs.....	- 40 -
3.2. La superfamille des phosphopantéthéinyl transférases	- 40 -
3.3. Activité catalytique des PPTases	- 42 -
3.4. Structure des PPTases	- 43 -
4. Les polycétides et peptides non-ribosomaux de <i>E. coli</i>	- 44 -
4.1. Les sidérophores, des molécules impliquées dans l'acquisition du fer.....	- 45 -
4.1.1. <i>Acquisition du fer par les bactéries</i>	- 45 -
4.1.2. <i>Acquisition du fer via les sidérophores</i>	- 46 -
4.1.3. <i>Acquisition du fer sidérophores-indépendante</i>	- 52 -
4.2. La colibactine, une génotoxine bactérienne	- 53 -
4.2.1. <i>L'îlot génomique pks</i>	- 53 -
4.2.2. <i>Distribution de l'îlot pks</i>	- 54 -

4.2.3. Biosynthèse de la colibactine	- 55 -
4.2.4. Régulation de la colibactine	- 57 -
4.2.5. Activité de la colibactine.....	- 58 -
4.2.6. Effets de la colibactine.....	- 58 -
5. Les PPTases de <i>E. coli</i>	- 61 -
5.1. La PPTase EntD de <i>E. coli</i>	- 61 -
5.2. La PPTase ClbA de <i>E. coli</i>	- 63 -
CHAPITRE III : RÉGULATION DE L'HOMÉOSTASIE DU FER	- 65 -
1. Détoxification et stockage du fer	- 65 -
1.1. Stress oxydatif.....	- 65 -
1.2. Stockage	- 66 -
2. Régulation de l'homéostasie du fer	- 66 -
2.1. La protéine Fur	- 66 -
2.1.1. Propriétés	- 67 -
2.1.2. Mécanisme d'action	- 68 -
2.1.3. Régulon et rôles de Fur.....	- 70 -
2.2. Le petit ARN RyhB	- 71 -
2.2.1. Propriétés	- 71 -
2.2.2. Mécanismes d'action.....	- 72 -
2.2.3. Régulon et rôles de RyhB.....	- 75 -
3. L'homéostasie du fer dans les relations hôte-pathogènes	- 78 -
3.1. Homéostasie du fer chez l'hôte	- 78 -
3.2. La bataille pour le fer dans l'intestin	- 80 -
3.2.1. Compétition hôte-bactéries.....	- 81 -
3.2.2. Compétition bactéries-bactéries	- 82 -
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	- 85 -
OBJECTIFS.....	- 87 -
CHAPITRE I : L'HOMÉOSTASIE DU FER RÉGULE LA GÉNOTOXICITÉ DES <i>ESCHERICHIA COLI</i> QUI PRODUISENT LA COLIBACTINE.....	- 89 -
CHAPITRE II : LA SUPPLÉMENTATION EN FER INHIBE LA SYNTHÈSE DE LA COLIBACTINE PAR LES <i>ESCHERICHIA COLI</i> PATHOGÈNES VIA UNE VOIE FUR/RYH B NON CANONIQUE	- 103 -
CHAPITRE III : LA CARENCE EN FER INDUIT LA REDIRECTION DE ClbA VERS LA BIOSYNTHÈSE DES SIDÉROPHORES.....	- 127 -
CHAPITRE IV : LA GÉNOTOXINE COLIBACTINE JOUE UN RÔLE DANS LA COLONISATION DE L'INTÉSTIN.....	- 141 -
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	- 153 -
RÉGULATION DE LA COLIBACTINE.....	- 155 -
RÔLE DE LA COLIBACTINE ET DE LA CONNEXION COLIBACTINE/SIDÉROPHORES DANS LA COLONISATION INTESTINALE	- 161 -
HÔTE, FER ET ÉMERGENCE DU GROUPE PHYLOGÉNÉTIQUE B2	- 167 -
CONCLUSION GÉNÉRALE	- 171 -
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	- 173 -
ABSTRACT.....	- 199 -

TABLE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A.....	Adénylation	H-NS	<i>Histone-like Nucleoid-Structuring Protein</i>
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>	HPI.....	<i>High Pathogenicity Island</i>
ACP.....	Acyl Carrier Protein	Hsp	<i>Heat shock protein</i>
ADN.....	Acide DésoxyriboNucléique	HtpG.....	<i>High-temperature protein G</i>
ADP	Adénosine DiPhosphate	IPEC	<i>Intestinal Pathogenic E. coli</i>
AMP	Adénosine MonoPhosphate	kb.....	kilobases
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>	kDa	kiloDaltons
ARN	Acide RiboNucléique	KR	KétoRéductase
ARNm.....	ARN messenger	KS.....	KétoSynthase
AT.....	Acyltransférase	LB.....	<i>Lysogeny Broth</i>
ATP.....	Adénosine TriPhosphate	LC/MS.....	<i>Liquid Chromatography/Mass Spectrometry</i>
C.....	Condensation	LEE.....	Locus d'Effacement des Entérocytes
CFU.....	<i>Colony Forming Unit</i>	MFS	<i>Major Facilitation Superfamily</i>
CoA.....	Coenzyme A	MLEE	<i>MultiLocus Enzyme Electrophoresis</i>
Cy	Cyclodéshydratase	MLST.....	<i>MultiLocus Sequence Typing</i>
DcytB.....	<i>Duodenal CYTochrome B</i>	MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
DH	DésHydratase	NGAL	<i>Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin</i>
DMEM...	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	NRP.....	<i>NonRibosomal Peptide</i>
DMT1	<i>Divalent Metal Transporter 1</i>	NRPS.....	<i>NonRibosomal Peptide Synthetase</i>
DNA.....	<i>DesoxyriboNucleic Acid</i>	ns.....	<i>Non-Significant</i>
E.....	Epimérase	OD	<i>Optical Density</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Ox.....	Oxydase
ECOR	<i>E. coli COllection Reference</i>	PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
ED.....	Entner-Douroroff	PCP	<i>Peptidyl Carrier Protein</i>
ExPEC	<i>Extraintestinal Pathogenic E. coli</i>	PCR.....	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>	PK	<i>PolyKetide</i>
FISH.....	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>	PKS	<i>PolyKetide Synthase</i>
Fur.....	<i>Ferric Uptake Regulator</i>	PP	Pentoses Phosphates
GI	Gastro-intestinal	P-pant.....	4'-phosphopantéthéinyl
GTP.....	Guanosine TriPhosphate		
Hfq	<i>Host Factor for phage Qβ</i>		

PPTase PhosphoPantéthéinyl Transférase
RBS *Ribosome Binding Site*
RLU *Relative Luminescence Unit*
RNA *RiboNucleic Acid*
RNAP *RNA Polymerase holo enzyme*
RND *Resistance Nodulation and cell Division*
ROS *Reactive Oxygen Species*
SASP ... *Senescent-Associated Secretory Pattern*
SEM *Standard Errors of the Mean*
sRNA *small RNA*
T *Thiolation*
TCA *TriCarboxylic Acid*
TE *ThioEstérase*
T3SS *Type III Secretion System*
uof *Upstream Of Fur*
WT *Wild Type*

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Densité bactérienne au sein du tractus gastro-intestinal.....	- 18 -
Figure 2. Localisation du microbiote intestinal au sein du tractus intestinal et à la surface des cellules épithéliales.	- 18 -
Figure 3. Représentation simplifiée de l'évolution du microbiote au cours de la vie.	- 20 -
Figure 4. Facteurs influençant la mise en place du microbiote pendant la période néonatale-	21 -
Figure 5. Distribution phylogénétique de <i>E. coli</i>	- 27 -
Figure 6. Plasticité génomique de <i>E. coli</i>	- 28 -
Figure 7. Les différentes voies du métabolisme central et exemples de mutants testés pour la colonisation dans l'intestin de souris.	- 30 -
Figure 8. Évolution de la prévalence du groupe phylogénétique B2 de <i>E. coli</i> en France... -	33 -
Figure 9. Organisation modulaire des mégasynthèses NRPS (A) et PKS (B).	- 36 -
Figure 10. Cycles de biosynthèse des mégasynthèses PKS(A) et NRPS (B).....	- 38 -
Figure 11. Les trois familles de PPTases.	- 41 -
Figure 12. Activité catalytique des PPTases.	- 43 -
Figure 13. Superposition de monomères d'AcpS avec Sfp de <i>B. subtilis</i>	- 44 -
Figure 14. Systèmes d'acquisition du fer chez les bactéries à Gram négatif.....	- 46 -
Figure 15. Les différents types de sidérophores.	- 47 -
Figure 16. Organisation génétique des <i>clusters</i> codant les sidérophores (A) et les étapes de l'acquisition du fer par les sidérophore (B).	- 48 -
Figure 17. Organisation génomique de l'îlot <i>pks</i>	- 53 -
Figure 18. Structure et biosynthèse des précolibactines.	- 56 -
Figure 19. Modèle de la synthèse et de l'export de la colibactine.	- 57 -
Figure 20. Effets de la colibactine sur les cellules eucaryotes.....	- 59 -
Figure 21. Biosynthèse de l'entérobactine et activation de EntB et EntF par EntD et groupe de gènes codant l'entérobactine.	- 62 -
Figure 22. Prédiction de la structure tridimensionnelle de ClbA (RaptorX)	- 63 -
Figure 23. Structure cristallisée de la protéine dimérique Fur.....	- 67 -
Figure 24. Modèle classique de répression des gènes par Fur.....	- 68 -
Figure 25. Modèles d'activation de l'expression des gènes <i>via</i> Fur	- 69 -
Figure 26. Régulation de l'homéostasie du fer par Fur et RyhB.	- 71 -
Figure 27. Structure secondaire du petit ARN RyhB.....	- 72 -
Figure 28. Représentation simplifiée des mécanismes d'action du petit ARN RyhB.....	- 73 -
Figure 29 Répartition du fer présent dans l'organisme.....	- 78 -
Figure 30 Homéostasie du fer chez l'hôte et régulation par l'hepcidine.	- 79 -
Figure 31 Modèle général de la production de colibactine en fonction du fer.....	- 157 -
Figure 32. Facteurs pouvant expliquer l'émergence du groupe phylogénétique B2 de <i>E. coli</i>	- 172 -

Synthèse bibliographique

CHAPITRE I : LE MICROBIOTE INTESTINAL, NICHE PRIMAIRE DE *ESCHERICHIA COLI*

1. Le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal désigne l'ensemble de la population de micro-organismes vivant au sein du tractus gastro-intestinal et qui cohabitent avec l'hôte. Il joue un rôle crucial dans les fonctions digestive, métabolique, immunitaire et neurologique [1,2].

1.1. Généralités

Le nombre de microorganismes constituant le microbiote est estimé à environ 10^{14} , ce qui représente en moyenne dix fois le nombre total de cellules du corps humain [3–5]. Des techniques basées sur l'analyse de la diversité des génomes montrent que le microbiote se divise en environ 50 grands phyla, mais deux prédominent : les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* [6]. Des proportions moins importantes sont retrouvées pour d'autres phyla comme *Actinobacteria* et *Proteobacteria* restant néanmoins majoritaires par rapport à des phyla comme *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria* ou *Cyanobacteria* [7,8].

Le microbiote intestinal est composé de trois types de flores, l'une dite « dominante » (10^{10} à 10^{12} CFU/g de contenu) composée principalement de bactéries anaérobies strictes comme les *Bacteroidetes*, les *Firmicutes*... Une autre dite « sous-dominante » (10^6 à 10^8 CFU/g de contenu) et principalement composée de bactéries aérobies/anaérobies facultatives comme les Entérobactéries, les Streptocoques et les Entérocoques. Enfin, la flore dite « transitoire » et qui ne s'implante pas durablement dans le tractus gastro-intestinal (GI) et composée d'espèces bactériennes de passage comme *Citrobacter*, *Klebsiella* ou encore *Enterobacter*.

Alors que 10^1 à 10^3 bactéries par gramme de contenu luminal sont retrouvées dans l'estomac et le duodénum, leur nombre culmine à environ 10^{11} dans le côlon [8,9] (Figure 1).

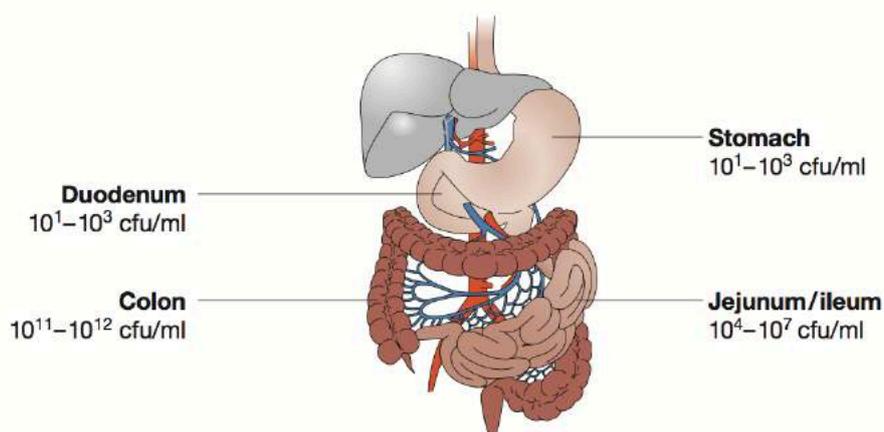


Figure 1. Densité bactérienne au sein du tractus gastro-intestinal.
D'après [9]

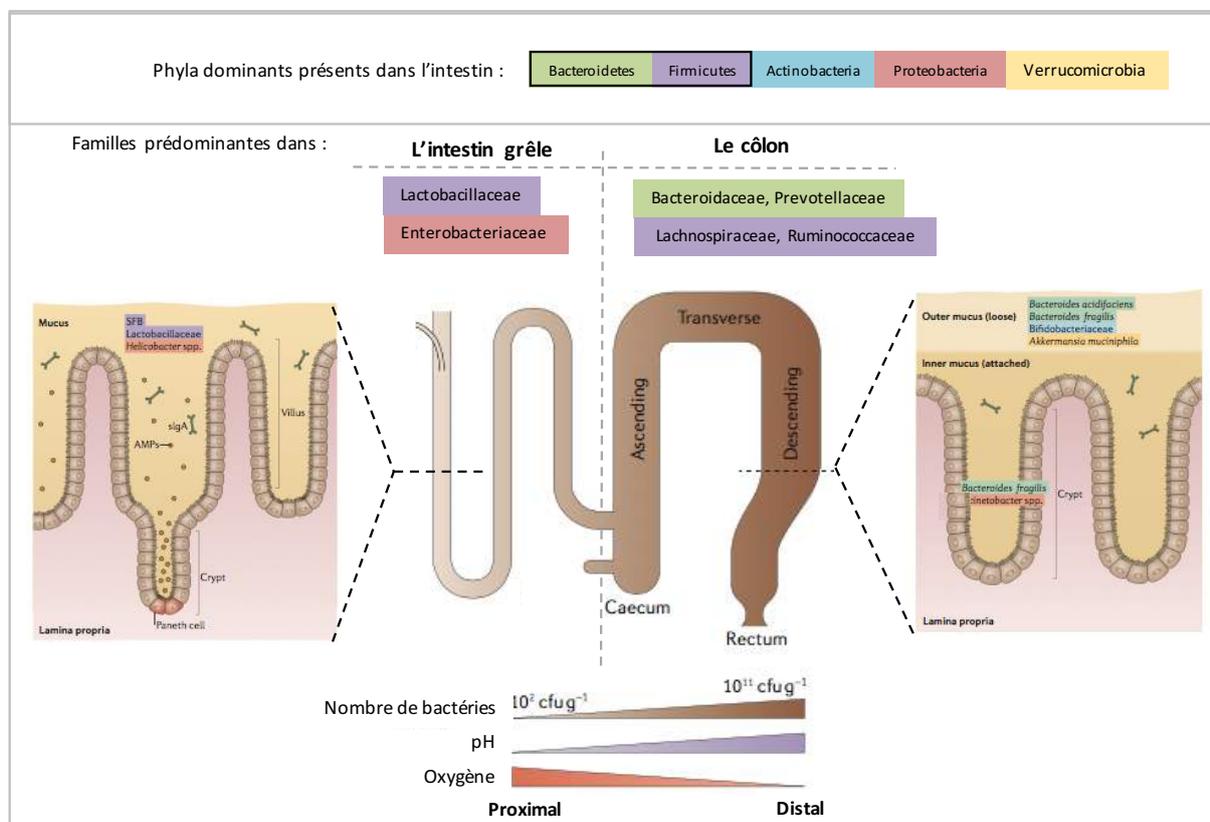


Figure 2. Localisation du microbiote intestinal au sein du tractus intestinal et à la surface des cellules épithéliales.

Les différentes familles bactériennes se répartissent le long de l'intestin, reflétant les différences physiologiques qui existent selon la localisation (gradient de pH et d'oxygène par exemple). La couche de mucus diffère également selon la localisation : alors que l'intestin grêle (à gauche) ne contient qu'une seule couche, le côlon contient deux couches de mucus qui possèdent des propriétés différentes, entraînant une localisation différentielle des différentes bactéries qui colonisent l'intestin. Adapté de [8].

Le tractus GI se compose d'une variété d'habitats distincts s'étalant de l'estomac au rectum. Par exemple, l'intestin grêle est plus acide et contient un niveau d'oxygène plus important que

dans le côlon. Ainsi, la communauté microbienne dans l'intestin grêle est dominée par des bactéries anaérobies facultatives, comme les *Firmicutes* et les *Actinobactéries*, alors que la prévalence des *Bacteroidetes* est plus importante dans le côlon, qui contient la plus dense et la plus diverse communauté microbienne de tous les habitats du corps [8] (Figure 2).

En plus de l'hétérogénéité longitudinale retrouvée pour la composition du microbiote intestinal, il existe une grande variation transversale, de l'épithélium intestinal vers le centre de la lumière intestinale. En effet, le long de l'intestin grêle et du côlon, des cellules épithéliales spécialisées, appelées cellules caliciformes ou cellules à mucus, sécrètent une couche de mucus, créant une frontière entre la lumière de l'intestin et les tissus de l'hôte, et dont l'épaisseur varie selon la région. Le gel de mucus tapisse et lubrifie la paroi intestinale facilitant ainsi le passage des selles et protégeant l'épithélium contre l'érosion mécanique et les agressions pathogènes. Alors que l'intestin grêle contient une fine couche de mucus, la couche de mucus du côlon est organisée en deux couches [8,10–12] (Figure 2):

- **Une couche mince** en contact étroit avec l'épithélium, généralement considérée comme stérile et difficile à dégrader. Le gel de mucus adhérent fournit une matrice pour la rétention d'un large éventail de molécules bioactives incluant les mucines, des glycoprotéines, les facteurs trefoils, des peptides antimicrobiens et des immunoglobulines A sécrétées (sIgA).
- **Une couche externe**, non adhérente et plus épaisse, remplacée lors des mouvements de péristaltisme et dégradée plus facilement par l'activité enzymatique de certaines bactéries (glycosidases). Cette couche héberge de nombreuses bactéries de la flore commensale intestinale. En effet, les bactéries sont capables de pénétrer le gel de mucus non adhérent et de se lier via leurs adhésines de surface aux nombreux glycanes portés par les protéines du mucus. Enfin, la richesse du mucus en oligosaccharides apporte une source d'énergie pour les bactéries commensales, qui, *via* l'expression d'enzymes spécialisées, libèrent de nombreux sucres en dégradant les polymères de mucines. Les résidus peuvent à la fois être utilisés par les bactéries comme source d'énergie mais aussi être transformés en acides aminés à chaîne courte qui, après diffusion à travers le gel de mucus, gagnent l'épithélium et contribuent à l'homéostasie intestinale [13].

Ainsi, les Lactobacilles et les Entérocoques sont détectés dans le gel de mucus et les cryptes intestinales de l'intestin grêle alors que certaines Bacteroides, les Bifidobactéries et les Streptocoques sont retrouvés dans les fèces.

1.2. Mise en place microbiote

L'établissement du microbiote résulte de diverses séquences de colonisation bactérienne, et ce dès la naissance. La présence de bactéries dans le liquide amniotique de nouveau-nés suggère que les nouveau-nés ne sont pas stériles à la naissance [14,15]. Cependant, au moment de la naissance le nouveau-né se retrouve exposé à de nombreuses bactéries provenant de sa mère (flore vaginale, intestinale et cutanée) et de son environnement immédiat (milieu hospitalier, etc....). Ainsi, les bactéries sont détectables dans les fèces quelques heures après la naissance [16]. Le tractus GI est d'abord colonisé par les bactéries aérobies et anaérobies facultatives, puis, en consommant l'oxygène ces bactéries permettent la colonisation par des bactéries anaérobies strictes [17] (Figure 3).

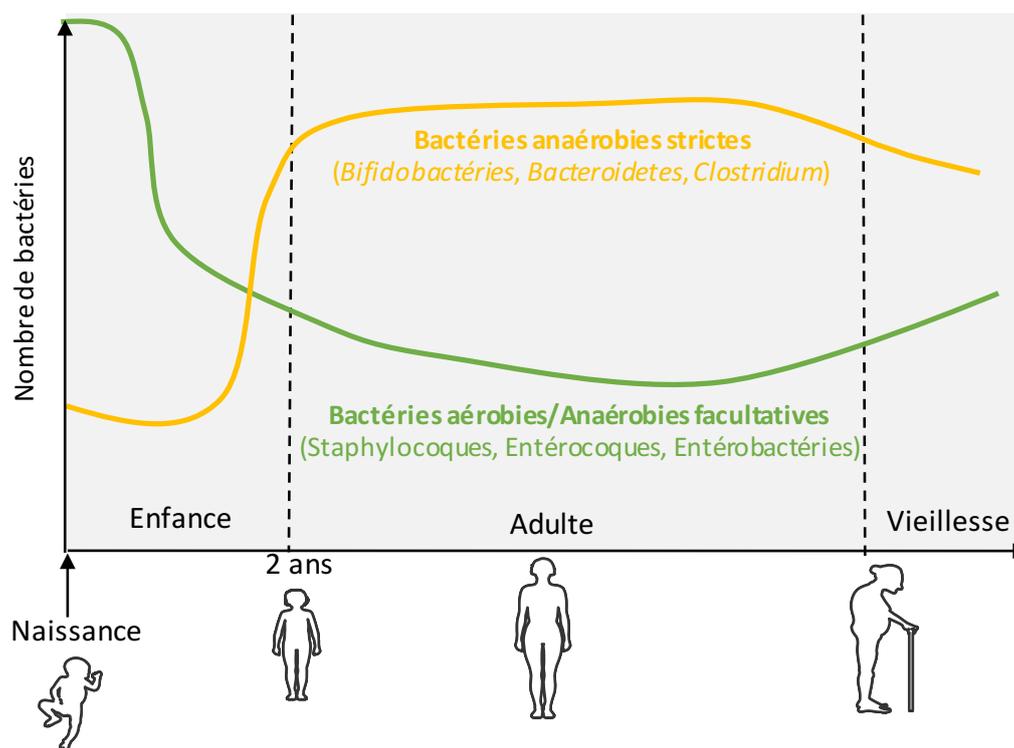


Figure 3. Représentation simplifiée de l'évolution du microbiote au cours de la vie.

Inspiré de [18]

À la fin de la première année de vie, le microbiote intestinal se stabilise et se complexifie pour ressembler à celui de l'adulte.

La composition du microbiote se diversifie en fonction de différents paramètres comme l'allaitement et se stabilise après la diversification alimentaire. En effet, une fois établie, la composition du microbiote est spécifique à l'hôte et relativement stable [18–20].

1.3. Les facteurs influençant la mise en place du microbiote pendant la période néonatale

La période comprise entre la naissance et la diversification du régime alimentaire est une période critique pour le déroulement de la colonisation du tractus intestinal [21,22]. De nombreux facteurs sont impliqués dans la modulation de la composition du microbiote intestinal tout au long de la vie. Certains sont liés à l'hôte (terrain génétique, âge, état de santé...), d'autres sont liés au régime alimentaire et à l'environnement (antibiothérapies, climat, stress...) [23]. Quelques-uns des facteurs influençant la composition du microbiote intestinal pendant la période néonatale sont discutés ci-après (Figure 4) :

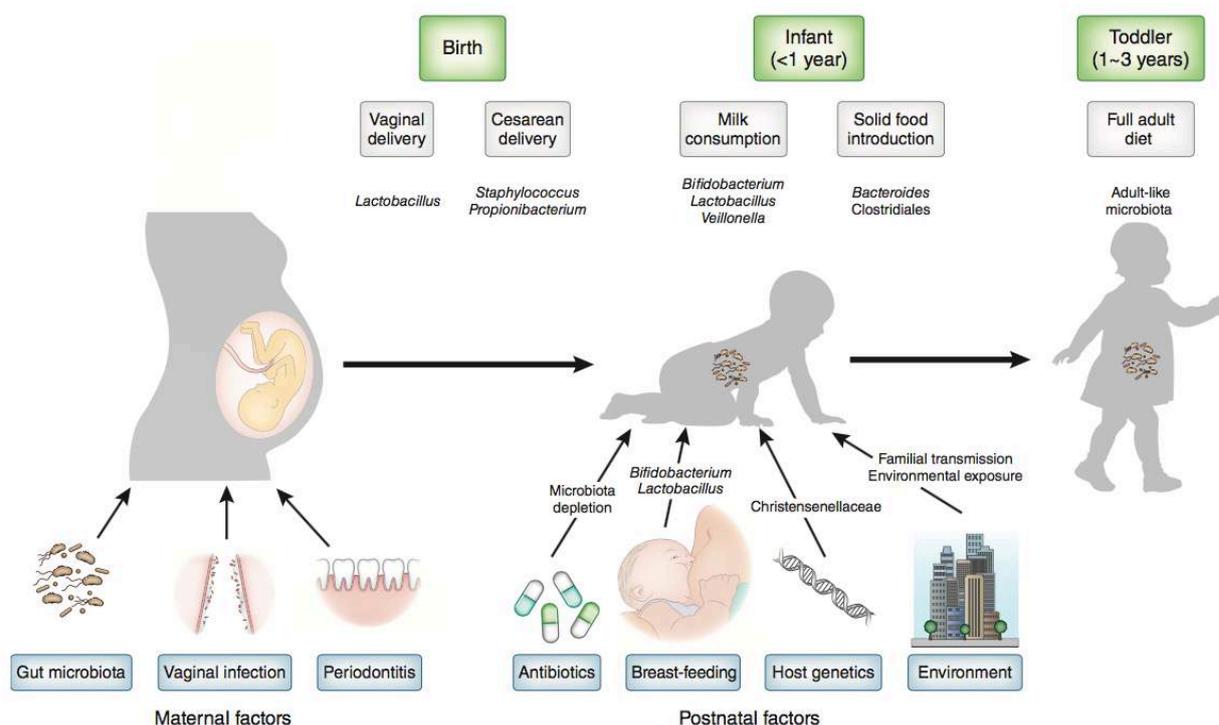


Figure 4. Facteurs influençant la mise en place du microbiote pendant la période néonatale

Les infections vaginales ou les périodonties peuvent aboutir à une invasion de l'environnement utérin. Le microbiote oral ou intestinal peut être transporté *via* la circulation sanguine, de la mère au fœtus. Le mode d'accouchement modifie également l'inoculum initial des nouveau-nés. Pendant la période post-natale, d'autres facteurs comme l'utilisation d'antibiotique, l'alimentation (lait maternel vs lait maternisé ou l'introduction d'alimentation solide), la génétique de l'enfant et les expositions à l'environnement entraînent la configuration du microbiote. Les bactéries associées avec les différents processus sont indiquées. D'après [22].

1.3.1. Le mode d'accouchement

Les enfants nés par voie basse sont colonisés par les bactéries fécales et vaginales de la mère, notamment *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* [24]. En revanche, les enfants nés par césarienne sont initialement exposés à l'environnement hospitalier. Ils présentent une composition du microbiote différente de ceux nés par voie basse, et acquièrent des espèces bactériennes proches de celles retrouvées notamment sur la peau de leur mère [24–26]. Si une étude montre que le nombre de *Escherichia coli* (*E. coli*) augmente chez les enfants nés par césarienne [23], elle est en désaccord avec une étude publiée plus tôt, qui montre que même si le nombre des Entérobactéries augmente chez ces enfants, le nombre de *E. coli* est moins important [27].

Enfin, il a été montré, d'une part que les différences observées entre les enfants nés naturellement ou par césarienne sont toujours visibles plusieurs mois après la naissance et jusqu'à plusieurs années après [23,28]; d'autre part, que le microbiote intestinal des enfants nés par césarienne est moins diversifié et contient moins de bactéries que le microbiote d'enfants nés par voie basse [25,26]. De plus, Biasucci *et al.* rapportent des profils de variation inter- et intra-groupes plus grands chez les enfants nés naturellement que chez les enfants nés par césarienne.

1.3.2. L'alimentation du nouveau-né

Le lait influence fortement le développement du microbiote intestinal [29]. En effet, le lait maternel contient un large éventail de nutriments nécessaires à la croissance de l'enfant tels que des carbohydrates, des nucléotides, des acides gras, des immunoglobulines, des cytokines, des lactoferrines et des facteurs immunomodulateurs [30,31]. En plus de ces nutriments, le lait maternel abrite un nombre important d'espèces bactériennes telles que les Staphylocoques, les Lactobacilles, les Streptocoques, les Bifidobactéries et des *E. coli*, provenant probablement de la peau du sein et des conduits lactaires [32,33].

Si le lait maternel fournit l'équilibre optimal de nutriments requis pour la croissance et le développement de l'enfant, la formule infantile est essentielle quand l'alimentation par le sein n'est pas suffisant, possible ou désiré. Sa composition complexe vise à se rapprocher le plus possible de la composition du lait maternel [34]. Ainsi, l'addition de prébiotiques (fructo- et

galacto-oligosaccharides) et probiotiques (*Lactobacillus*) a été décrite pour stimuler la croissance des Bifidobactéries et des Lactobacilles de manière similaire au lait maternel [35,36]. Cependant, des différences importantes demeurent, entraînant des modifications dans la composition du microbiote chez l'enfant.

Les modifications du microbiote chez l'enfant en fonction du type de lait sont encore mal connues, et font l'objet d'études controversées. En effet, une étude épidémiologique effectuée sur une cohorte de 1032 enfants âgés d'un an montre que les enfants alimentés avec une formule infantile sont plus souvent colonisés avec *E. coli*, *C. difficile*, *B. fragilis* et les Lactobacilles que les enfants uniquement nourris au sein [23]. Cette étude est en accord avec trois autres études publiées plus tôt [37–39]. En revanche, plus récemment, une étude effectuée sur douze enfants, six nourris avec le lait maternel, six autres nourris avec une formule infantile, vient contredire ces résultats [40]. En effet, si le microbiote des enfants alimentés avec une formule infantile présente un nombre de *Bifidobacterium* plus important que le second groupe, ce qui est en accord avec les autres études, le nombre de *E. coli* est moins important que chez les enfants nourris au lait maternel.

Il est important de noter que le lait maternel est composé en moyenne de 0,5 mg/L de fer. Or dans les formules infantiles, la concentration de fer minimale est d'environ 4 mg/L et peut monter jusqu'à 12 mg/L lorsqu'une supplémentation en fer chez le nouveau-né est recommandée [41,42]. Ainsi, la composition en fer des formules infantiles est en moyenne 10 à 60 fois plus concentrée que dans le lait maternel.

1.3.3. Le fer dans l'alimentation

Le nombre d'études portant sur l'effet du fer alimentaire sur le microbiote intestinal est en augmentation depuis ces dernières années, mais certaines sont controversées.

- *Etudes épidémiologiques chez l'Homme.*

Une première étude menée en 1989 montre que les enfants alimentés avec une formule infantile supplémentée de lactoferrine ou de lactoferrine et de fer, aboutit à une augmentation du nombre de *E. coli* dans le groupe dans lequel le fer a été ajouté. En revanche, aucun effet n'a été observé sur le nombre de *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*,

Bacteroides et de *Clostridia* [43]. Un peu plus tard, le même groupe publiera les effets d'une alimentation avec du lait maternel supplémenté en fer (sans ajout de lactoferrine cette fois-ci). Si les résultats de cette étude montrent que cette supplémentation induit une augmentation des *Clostridia* et une diminution des *Bacteroides*, aucun effet n'est observé sur les *E. coli*, les *Coliformes*, les *Bifidobacteriaceae* et les *Lactobacillaceae* [44].

Il a récemment été montré que la supplémentation en fer entraîne une augmentation du nombre de bactéries potentiellement pathogènes, comme les *Enterobacteriaceae*, dans le microbiote intestinal d'enfants habitant en Côte d'Ivoire [45]. Cette augmentation est associée à une diminution de bactéries bénéfiques telles que les *Lactobacillaceae* et une augmentation de calprotectine, un marqueur de l'inflammation intestinale. Des conséquences similaires ont été observées chez des enfants Kényans [46]. En effet, la supplémentation entraîne l'augmentation des *Enterobacteriaceae* parmi lesquelles l'espèce *E. coli*. De plus, cette supplémentation induit une inflammation de l'intestin.

- *Etudes in vivo chez l'animal*

Une étude menée chez des porcelets sevrés, rapporte qu'une supplémentation en fer dans l'alimentation augmente le nombre de bactéries coliformes dans l'intestin, mais n'a aucun effet sur le nombre de *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacillaceae* et *Clostridia* [47]. Deux autres études indépendantes montrent que les souris recevant une alimentation carencée en fer présentent une augmentation du nombre de *Lactobacillaceae* dans la microflore intestinale, comparé au groupe contrôle [48,49].

Chez le rat, une première étude publiée en 1993 montre une augmentation des *E. coli*, *Lactobacillaceae* and *Clostridium spp.* après deux semaines de supplémentation en fer dans l'alimentation [50]. Une étude plus récente décrit une augmentation du nombre d'*Enterobacteriaceae* et des *Lactobacillaceae* chez des rats carencés en fer alimentaire, accompagné d'une diminution des *Bacteroides spp.* La supplémentation en fer restaure le taux basal du nombre de *Lactobacillaceae* et *Enterobacteriaceae* [51]. Le même groupe publiera deux ans plus tard une étude qui montre que différentes doses de fer alimentaire causent peu d'effet sur l'abondance des taxons bactériens dominants [52]. Par ailleurs, Etreiki *et al.* ont montré que la quantité du fer ferrique n'a pas d'impact sur les *Bacteroidetes*, *Enterobacteriaceae* et les *Firmicutes* [53].

- *Etudes in vitro*

Les études *in vivo* décrites ci-dessus illustrent le fait que les effets d'une supplémentation ou d'une carence en fer alimentaire aboutit à une variété de résultats contradictoires. En travaillant *in vivo*, d'autres facteurs dépendants de l'hôte ou de l'environnement peuvent intervenir. Par exemple, le statut de l'homéostasie du fer de l'hôte peut varier selon le fond génétique du modèle rongeur utilisé. Ainsi, l'étude *in vitro*, dans des modèles de fermentation par exemple [54], de l'impact du fer sur la modification des populations bactériennes de l'intestin peut être nécessaire, afin de mieux contrôler les paramètres, et représente ainsi une alternative intéressante. Quelques études menées *in vitro* montrent par exemple qu'une carence en fer induit une diminution du nombre de *Lactobacillaceae* and *Bifidobacteriaceae* [52,55].

En conclusion, il est important de mieux comprendre les effets de la variation de la quantité de fer dans l'alimentation sur le microbiote intestinal, afin de mieux adapter les traitements mis en jeu dans le cadre d'une carence martiale.

2. *E. coli*, une bactérie du microbiote intestinal

2.1. Généralités

E. coli est une bactérie à Gram négatif qui appartient au phylum des γ -Protéobactéries, à l'ordre des Entérobactéries et à la famille des *Enterobacteriaceae*. *E. coli* est la bactérie aérobie-anaérobie facultative majoritaire du tractus GI chez les mammifères. En effet, si elle peut être retrouvée comme saprophyte de l'eau et des boues [56], sa niche principale est l'intestin de l'Homme et des animaux à sang chaud [57]. Ainsi, plus de 90% de la population humaine est colonisée par *E. coli*.

Si *E. coli* est avant tout un hôte commensal du microbiote intestinal, elle est aussi un redoutable pathogène. Les bactéries de l'espèce *E. coli* posent en effet un réel problème de santé publique mondial, puisqu'elles causent plus de deux millions de décès chaque année dus aux diarrhées infantiles et aux infections extra-intestinales [57,58]. On distingue les souches de *E. coli* pathogènes selon la localisation intestinale ou extra-intestinale des

infections qu'elles produisent. Les souches de *E. coli* pathogènes extra-intestinales sont regroupées sous la dénomination commune ExPEC (pour *EXtra intestinal Pathogenic E. coli*) alors que les souches pathogènes intestinales sont regroupées sous le terme de IPEC (*Intestinal Pathogenic E. coli*) [59,60]. Les infections extra-intestinales regroupent les infections du tractus urinaire, les méningites néonatales, les pneumonies, ...

2.2. Diversité phylogénétique et plasticité génomique

L'une des premières classifications de *E. coli* a été basée sur la distribution non aléatoire des antigènes ou sérotypages, et a été réalisée pour la première fois en 1976 par Orskov *et al.* [61]. Ainsi, *E. coli* peut être classifiée en sérovars en fonction de l'association de plusieurs antigènes spécifiques : l'antigène O, l'antigène flagellaire H ou les antigènes de capsule K.

Dès le début des années 1980 avec les travaux de Thomas Whittam, Howard Ochman et Robert Selander [62], l'existence d'une structure génétique au sein de *E. coli* a été révélée. Ainsi, une collection de référence représentative de la diversité des souches de *E. coli*, appelée ECOR (pour *Escherichia coli Collection Reference*) est établie. Cette collection a été analysée par la méthode MLEE (pour *MuLtilocus Enzyme Electrophoresis*), permettant de distinguer la variabilité électrophorétique pour onze enzymes métaboliques et pour leur présence chez des hôtes et à des sites géographiques les plus divers possibles. L'objectif étant d'établir une collection de souches représentatives de la diversité génétique de l'espèce, et ainsi de mettre à disposition de nombreuses données génétiques et phénotypiques.

Les premiers phénogrammes obtenus grâce aux données du MLEE identifiaient quatre groupes phylogénétiques principaux (A, B1, B2 et D) au sein de la collection ECOR [63,64]. Une méthode basée sur le séquençage de huit gènes de ménage du *core genome* (*i.e.* l'ensemble des gènes présents chez toutes les souches d'une même espèce bactérienne) de *E. coli*, appelée la méthode MLST pour (*Multilocus sequence typing*) a ensuite été utilisée. Cette méthode a permis d'affiner la classification de *E. coli* en six groupes phylogénétiques distincts : A, B1, B2, D, E et F, les deux derniers appartenant auparavant au groupe D [65,66]. Plus récemment, le phylogroupe C a été proposé pour un sous-groupe de souches proches, mais distinctes du phylogroupe B1 [67]. On considère ainsi à l'heure actuelle que cette espèce bactérienne comprend sept groupes phylogénétiques principaux : A, B1, B2, C, D, E et F (Figure 5).

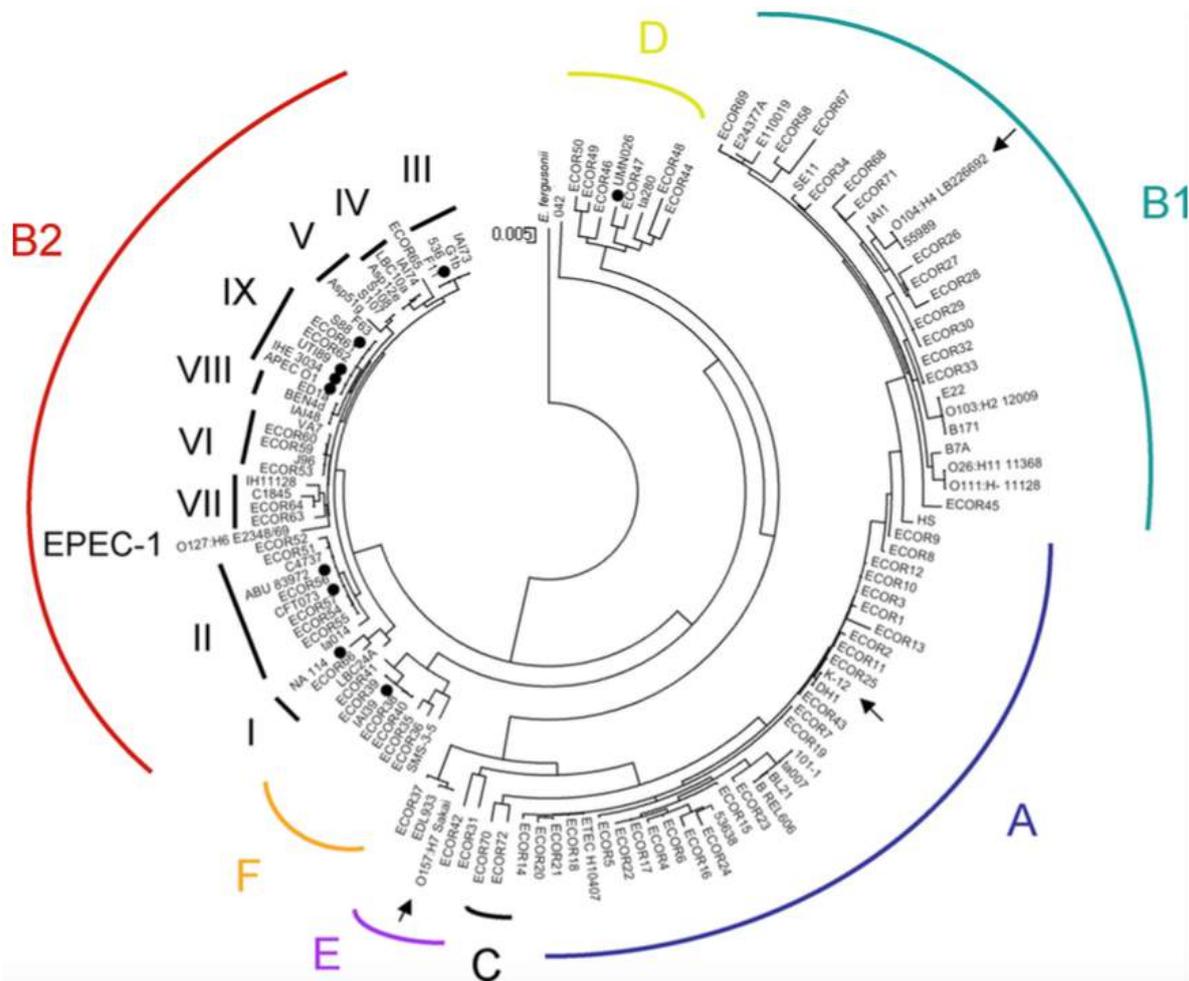


Figure 5. Distribution phylogénétique de *E. coli*

Analyse phylogénétique utilisant la méthode MLST révélant les sept groupes phylogénétiques majeurs de *E. coli* et faisant apparaître les sous-groupes du groupe phylogénétique B2. D'après [68].

La phylogénie de l'espèce a été confirmée grâce à la comparaison de 20 génomes entiers [69]. Par ailleurs, cette étude a mis en lumière la plasticité génomique de *E. coli*. En effet, le génome de *E. coli* contiendra environ 5 000 gènes, mais seulement environ 2 000 gènes sont conservés entre toutes les souches [69–71]. Ces gènes conservés forment le « *core genome* ». Par opposition, les gènes n'appartenant pas au *core genome* forment le « *dispensable genome* », qui regroupe des gènes non-essentiels seulement présents chez certaines souches. Ils sont responsables de la diversité phénotypique des souches et de leur capacité d'adaptation aux conditions environnementales. La somme des gènes du *core genome* et du *dispensable genome* définit le « *pan-genome* », qui regroupe donc la totalité des gènes retrouvés chez les souches de *E. coli*, et qui est aujourd'hui estimé à 18 000 gènes [72,73] (Figure 6). Possédant en moyenne 4 700 gènes, une souche de *E. coli* ne peut donc pas représenter à elle seule l'ensemble des caractéristiques de l'espèce [74].

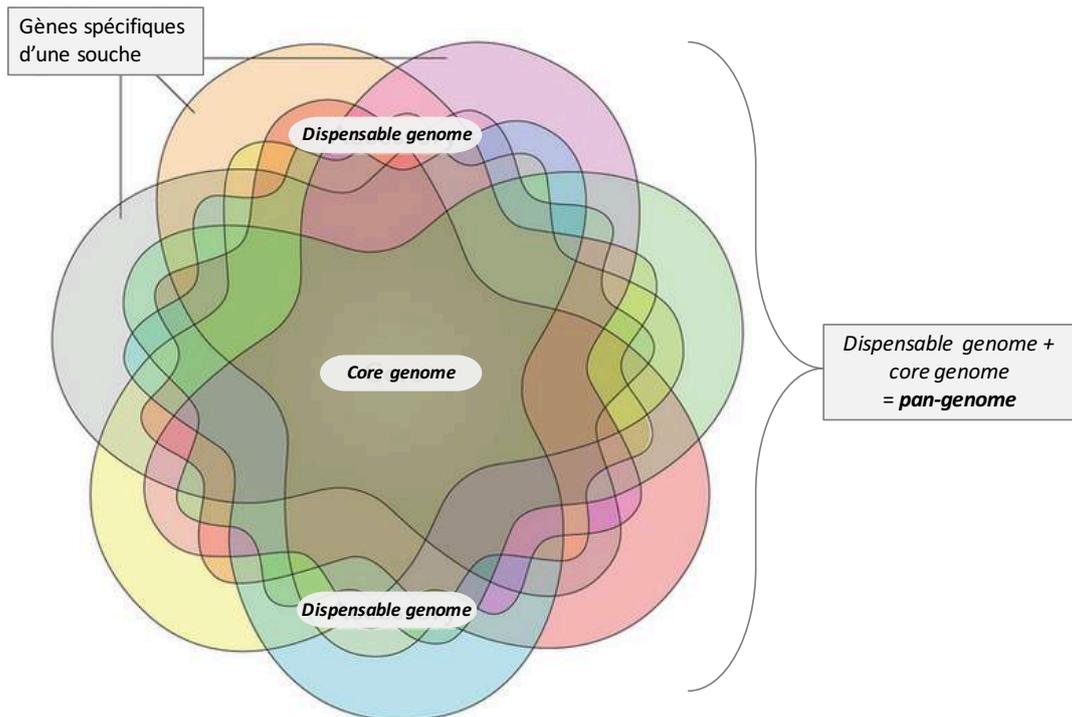


Figure 6. Plasticité génomique de *E. coli*.

Le génome de *E. coli* contient en moyenne 4 700 gènes. La somme des gènes du *core genome* et du *dispensable genome* constitue le *pan-génome*. D'après [75].

2.3. Commensalisme de *E. coli*

Toutes les souches de *E. coli* n'ont pas les mêmes capacités pour résider au sein du tractus GI chez l'Homme. Ainsi, l'étude de la capacité des souches à persister dans le microbiote intestinal humain a permis de différencier des souches dites résidentes, présentes dans le microbiote intestinal plusieurs semaines ou mois, des souches transitoires, présentes seulement quelques jours ou semaines. La capacité des souches de *E. coli* à coloniser le microbiote intestinal est liée à l'accumulation de facteurs pouvant contribuer à la persistance des souches dans la lumière intestinale.

Les premières bactéries à coloniser le nouveau-né sont les bactéries aérobie-anaérobie facultatives telles que les Entérobactéries ou les Lactobacilles. En effet, la présence d'oxygène dans le tube digestif au cours des jours qui suivent la naissance permet aux Entérobactéries, et notamment à *E. coli* d'être parmi les premières bactéries à coloniser l'intestin [76]. Elle est alors la bactérie majoritaire du microbiote intestinal avant l'expansion des bactéries anaérobies strictes.

Chez l'adulte, le nombre de *E. coli* se stabilise autour de 10^8 CFU (*Colony Forming Unit*) par gramme de fèces et décroît graduellement avec l'âge, intégrant alors la flore sous-dominante de l'hôte. Elle reste cependant la bactérie aérobie-anaérobie facultative la plus représentée.

Il a été montré que les souches de *E. coli* colonisant le tractus du nouveau-né s'implantent mieux et persistent plus longtemps après la naissance que les souches de *E. coli* apparues plus tard dans la vie de l'enfant [77], mettant en lumière le rôle crucial de la colonisation précoce dans le maintien de *E. coli* dans le tractus intestinal.

2.4. Facteurs impliqués dans la colonisation de *E. coli*

La capacité de *E. coli* à persister et se maintenir dans l'intestin découle de plusieurs facteurs, certains sont décrits ci-après :

2.4.1. Capacité à croître dans le mucus

La capacité de colonisation est définie par une persistance dans une population bactérienne particulière. Et si des facteurs comme la motilité ou l'adhérence peuvent contribuer à la colonisation intestinale [78], il semble que la compétition pour les nutriments soit primordiale. Ainsi, selon Freter, afin de coloniser, chaque espèce doit utiliser un nutriment limitant de manière plus efficace que les autres espèces bactériennes [79,80]. C'est l'hypothèse de la « niche de nutriments ».

Le site préférentiel de colonisation de *E. coli* est le gros intestin, plus particulièrement dans le colôn et le *caecum*, au niveau de la couche de mucus qui tapisse l'épithélium intestinal. De nombreuses études montrent que le gel de mucus serait une source de nutriments pour les *E. coli* [81–84]. Des expériences d'immunofluorescence en FISH (*fluorescence in situ hybridization*) de l'intestin murin ont montré que la souche *E. coli* BJ4, une souche commensale isolée chez le rat, était dispersée dans le gel de mucus mais non associée avec l'épithélium [81]. *In vitro*, une croissance rapide des souches de *E. coli* est observée dans du mucus intestinal. En revanche, *E. coli* entre en phase stationnaire en présence du contenu luminal [84,85]. Parmi les mutants de *E. coli* incapables de coloniser le tractus GI, nombreux sont ceux incapables de pénétrer, de survivre ou de croître dans le gel de mucus [86].

Il semble que la capacité des *E. coli* à se multiplier et à survivre dans le mucus soit une condition critique et nécessaire pour assurer la colonisation du tractus digestif.

2.4.2. Le métabolisme central

Le métabolisme central de *E. coli* consiste en la voie glycolytique Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la voie des pentoses phosphates (PP), la voie Entner-Doudoroff (ED), le cycle de Krebs (ou cycle TCA pour *tricarboxylic acid cycle*) et diverses autres voies de fermentation (Figure 7A).

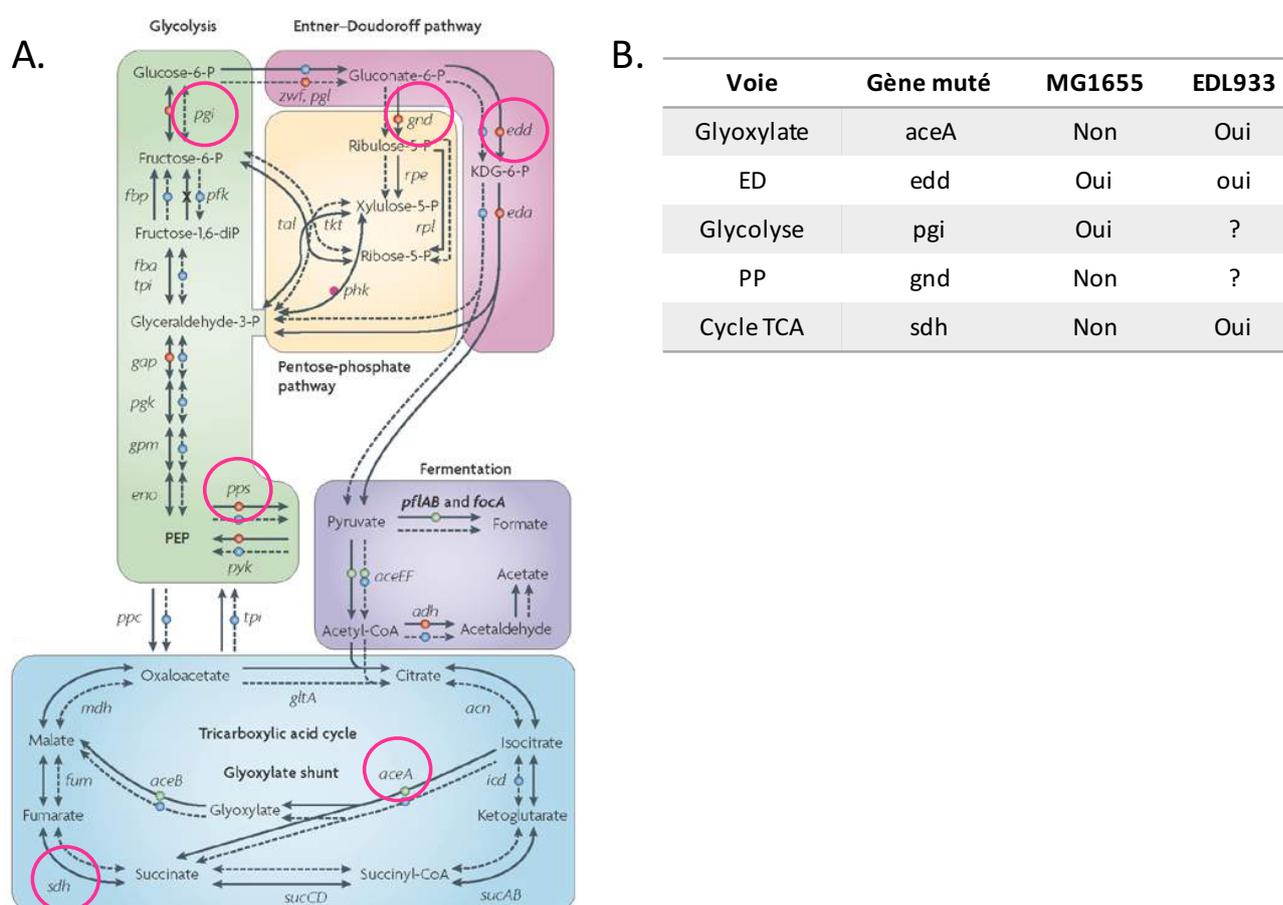


Figure 7. Les différentes voies du métabolisme central et exemples de mutants testés pour la colonisation dans l'intestin de souris.

A. Les différentes voies du métabolisme central de *E. coli*. B. Exemples des mutants testés dans la souche *E. coli* MG1655 (groupe phylogénétique A) et la souche EDL033 (O157:H7, souche entérohémorragique). « oui » signifie que la mutation correspondante induit un défaut de colonisation de l'intestin comparé à la souche sauvage associée. « non » signifie que la mutation n'a pas d'effet sur la colonisation.

Une souche de *E. coli* mutée pour la voie ED ou de la glycolyse présente un défaut de compétition avec la souche isogénique sauvage [82]. Par ailleurs, le gluconate est l'un des

premiers nutriments utilisé par *E. coli* pour coloniser l'intestin de souris traitées à la streptomycine [86]. Ainsi une souche mutée pour un des gènes essentiels à la voie ED (le gène *edd* par exemple), voie qui catabolise le gluconate entre autres, présente un défaut de colonisation [87] (Figure 7B). D'autres bactéries entériques, telles que *Salmonella typhimurium* et *Vibrio cholerae*, utilisent la voie ED pendant leur croissance dans les macrophages et pour coloniser l'intestin respectivement [88,89]. En revanche, la voie des PP ne semble pas essentielle à la colonisation de *E. coli* dans l'intestin [82].

L'implication du cycle de Krebs dans la colonisation de *E. coli* a été peu étudié. Cependant, il semblerait qu'une souche mutée pour la succinate déshydrogénase et la fumarate réductase présente un défaut de colonisation [82]. En revanche, la mutation seule de la succinate déshydrogénase (*Sdh*) n'affecte pas la colonisation de la souche mutée dans l'intestin, suggérant une redondance fonctionnelle des enzymes [90] (Figure 7B).

L'utilisation de mutants incapables de synthétiser du glucose par la voie des acides gras, de l'acétate ou des intermédiaires du cycle de Krebs a permis de montrer que ni la souche K-12 de laboratoire MG1655, ni la souche la souche EHEC EDL933 n'utilisent la voie de la gluconéogenèse pour coloniser l'intestin de souris traitées à la streptomycine dans le cas d'une mono-colonisation [81]. En revanche, la souche Nissle 1917 utilise cette voie pour coloniser le tractus intestinal [83]. En compétition avec une souche MG1655 ou Nissle 1917, la souche de *E. coli* EDL933 est capable de modifier son métabolisme, et d'utiliser la voie de la néoglucogenèse.

2.4.3. La disponibilité des nutriments et compétition

Leatham *et al.*, ont montré que la souche de *E. coli* commensale MG1655 était résistante à une colonisation supplémentaire par la même souche. En revanche la colonisation du tractus digestif par une souche de *E. coli* différente de la première est possible [91]. Il semble donc que différentes souches de *E. coli* ont des programmes nutritionnels différents permettant leur croissance dans l'intestin. Les différences d'efficacité de la colonisation par chaque souche de *E. coli* peut s'expliquer par l'occupation spécifique de niches écologiques différentes possédant des propriétés nutritionnelles qui leur sont propres.

De plus, afin de renforcer l'hypothèse que chaque souche de *E. coli* possède des propriétés différentes tant au niveau génétique que métabolique pour coloniser préférentiellement le

tractus GI, le choix des nutriments par chaque souche est porté par les gènes du *dispensable-genome* [92,93].

Ainsi, les différentes souches de *E. coli* utilisent des nutriments différents et qui peuvent ne pas être utilisés par les bactéries de la même espèce ou d'une espèce différente. Une étude montre par exemple que la souche de *E. coli* Nissle 1917, MG1655 et la souche pathogène EDL933 occupent des niches nutritionnelles uniques [94,95], et utilisent des sources carbonées différentes.

Certaines bactéries peuvent favoriser la croissance d'autres bactéries en leur fournissant des nutriments essentiels. Par exemple, contrairement aux bactéries anaérobies, *E. coli* ne peut pas dégrader les oligosaccharides et les polysaccharides, exceptée la dextrine [94,96]. L'obtention des mono- ou disaccharides nécessaire à la croissance de *E. coli* se fait grâce à l'hydrolyse des complexes polysaccharidiques par d'autres membres de la communauté intestinale, comme *Bacteroides thetaiotaomicron*, une bactérie à Gram négatif, anaérobie obligatoire [97–101].

2.5. Focus sur le groupe phylogénétique B2

2.5.1. Généralités

Les souches du groupe phylogénétique B2 et dans une moindre mesure les souches du groupe D constituent au sein de l'espèce *E. coli* deux groupes séparés des autres, à la fois en termes de phylogénie, mais également en termes de pathogénicité extra-intestinale. L'analyse génétique de 60 souches du groupe phylogénétique B2 sélectionnées pour leur diversité écologique et génétique a été réalisée par MLST [102]. Ainsi, neuf sous-groupes ont été identifiés, notés I à IX (Figure 5), dénotant une structure clonale. Plus récemment, un dixième sous-groupe a été décrit [103].

Les trois-quarts des souches du groupe B2 sont virulents lorsqu'elles sont testées dans un modèle murin de septicémie [104]. Cependant les facteurs de virulence peuvent conférer un avantage adaptatif dans des situations différentes de celles qui ont mis en évidence leur potentiel virulent. Ainsi, les facteurs de virulence seraient en réalité des facteurs de commensalisme originellement [102].

2.5.2. Prévalence du groupe phylogénétique B2

De grandes variations dans la prévalence des groupes phylogénétiques de *E. coli* sont retrouvées au sein des populations humaines. L'environnement joue un rôle crucial dans la diversité phylogénétique des souches commensales.

Une étude a comparé la prévalence des différents phylogroupes de *E. coli* de sujets français de la métropole expatriés en Guyane française, de français résidant en métropole et de natifs de la Guyane française [105]. Alors que le microbiote des français résidant en métropole et celui de natifs de la Guyane française étaient radicalement différents, le microbiote des expatriés était intermédiaire entre ces deux populations.

Le niveau d'hygiène et les habitudes alimentaires sont les principaux facteurs de distribution phylogénétique des groupes, plus que les conditions climatiques ou les caractéristiques génétiques de l'hôte ainsi que le suggère le changement radical de la proportion des groupes B2 et A en France durant les 20 dernières années [106]. En région parisienne la prévalence du groupe B2 est passé de 9,4% en 1981, 22,7% en 2001 et 34% en 2010 [107,108](Figure 8).

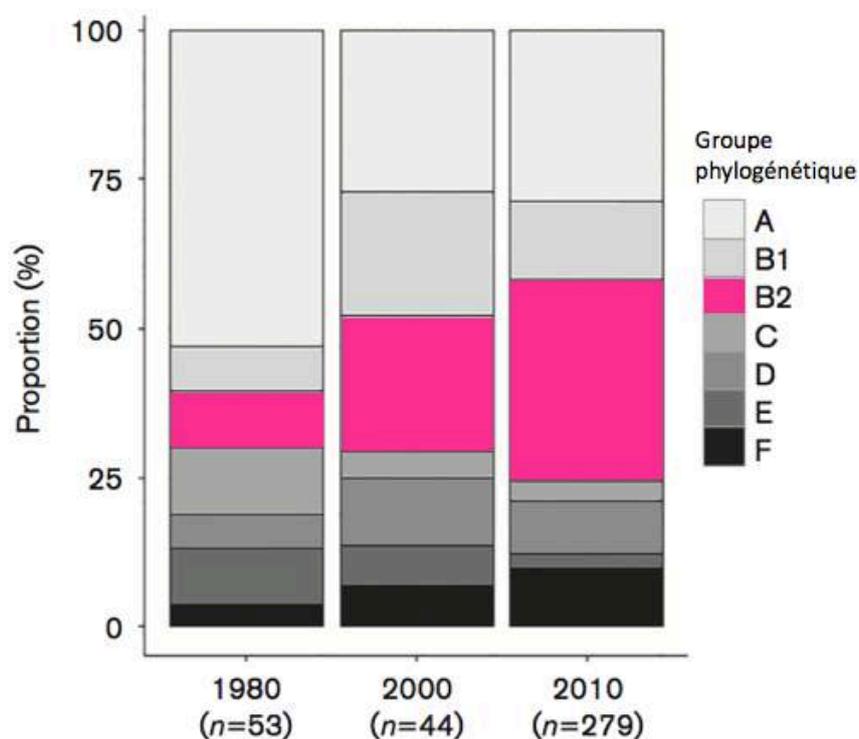


Figure 8. Évolution de la prévalence du groupe phylogénétique B2 de *E. coli* en France. D'après [108]

Cette tendance est également retrouvée en Amérique du Nord, au Japon et en Australie où, depuis les années 2000, les souches sont majoritairement du groupe phylogénétique B2. Les groupes phylogénétiques retrouvés en zone tropicale sont différents de ceux en zone tempérée, avec cette fois-ci une majorité de souches du groupe phylogénétique A [109].

La zone géographique semble également avoir un impact sur la distribution des groupes phylogénétiques de *E. coli*. En effet, une étude coréenne révèle qu'aucun isolat du groupe phylogénétique B2 n'a été retrouvé ni chez les humains, ni chez les animaux domestiques, alors que les *E. coli* B2 étaient présents dans les selles des animaux sauvages et dans les eaux de rivières [110].

Si des facteurs externes comme l'hygiène, l'alimentation ou la zone géographique peuvent entraîner une modification de la prévalence des populations phylogénétiques de *E. coli*, il a également été montré que des facteurs externes comme l'âge ou le sexe peuvent également influencer la distribution phylogénétique des souches de *E. coli* [106,111].

L'augmentation de la prévalence du groupe phylogénétique B2 chez certaines populations, peut également s'expliquer par le fait que ces souches semblent avoir une capacité supérieure à coloniser et persister dans la microflore intestinale [112,113].

CHAPITRE II : LES MÉTABOLITES SECONDAIRES DE TYPE POLYCÉTIDES ET PEPTIDES NON- RIBOSOMAux

1. Introduction aux métabolites secondaires

Le métabolisme d'un organisme comprend le métabolisme primaire, essentiel à la croissance et au développement, et le métabolisme secondaire, souvent nécessaire à l'interaction de l'organisme avec son environnement [114]. Présents dans tous les organismes du règne vivant, les métabolites secondaires dérivent des mêmes voies de biosynthèse que les métabolites primaires.

Les six voies principales du métabolisme secondaire synthétisent les terpénoïdes, les alcaloïdes, les peptides, les oligosaccharides, les polycétides (ou PK pour *polyketides*) et les peptides non-ribosomaux (ou NRP pour *nonribosomal peptides*) [115]. De nouveaux composés peuvent être synthétisés, sans créer de nouvelles voies de biosynthèse comme par exemple les molécules hybrides PK-NRP, grâce à des combinaisons de ces six voies principales du métabolisme secondaire [115,116].

Plus de 200 000 métabolites secondaires ont été identifiés et décrits, apportant une complexité et une diversité importante de molécules uniques. L'essentiel des médicaments appartient aux familles de composés PK, NRP et PK-NRP, tels que des antibiotiques, des antiparasitaires, des médicaments anticancéreux, antifongiques... et encore aujourd'hui, malgré l'expansion de la chimie médicinale synthétique, 50% des nouveaux médicaments restent basés sur des produits naturels [117].

2. Synthèse des PK, NRP et hybrides PK-NRP

2.1. Généralités

La biosynthèse des PK a été observée chez les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux. Celle des NRP a principalement été observée chez les bactéries et les champignons. Leur biosynthèse, indépendante des ribosomes, fait intervenir des complexes multienzymatiques appelées mégasynthèses : les PKS (PK synthase ou *polyketide synthase*), les NRPS (NRP synthase ou *nonribosomal peptide synthase*) ou les hybrides PKS-NRPS [118]. Ces mégasynthèses sont composées de plusieurs modules, eux-mêmes subdivisés en domaines qui catalysent une réaction enzymatique spécifique (Figure 9).

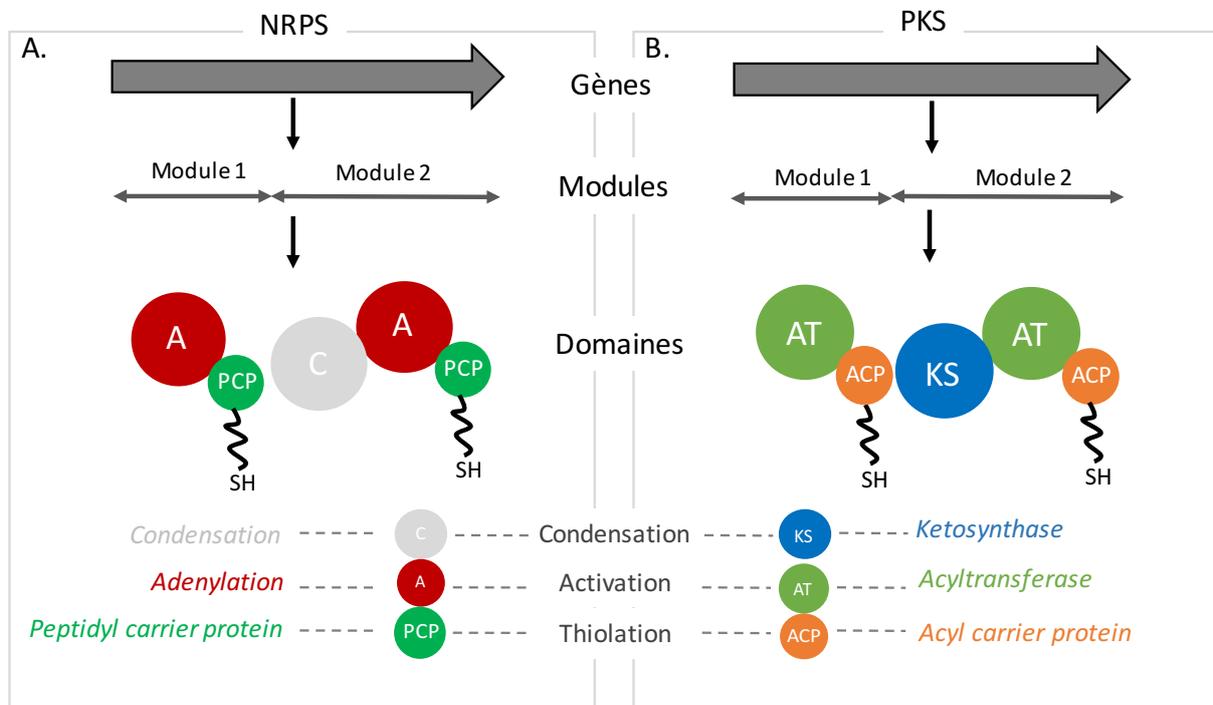


Figure 9. Organisation modulaire des mégasynthèses NRPS (A) et PKS (B).

Les gènes des mégasynthèses codent des modules enzymatiques. Ces modules peuvent être divisés en plusieurs domaines qui arborent chacun une activité catalytique : Condensation (C ou KS), Activation (A ou AT) et Thiolation (PCP ou ACP). Le module d'initiation ne contient pas de domaine de condensation. Adapté de [118]

2.2. Organisation des machineries enzymatiques

Les mégasynthèses PKS, NRPS ou PK-NRP assurent l'essentiel de la synthèse du squelette carboné, et leur activité repose sur trois domaines principaux dont l'association définit un module enzymatique (Figure 9), et auxquels peuvent s'ajouter des domaines optionnels [118] :

1. Le domaine de Thiolation (T) ou domaine porteur qui porte l'oligomère en cours d'élongation en fixant de manière covalente l'acide aminé monomérique sur la mégasynthase par une liaison thioester. La transformation du domaine de thiolation de sa forme active (apo-) à sa forme active (holo-) est catalysée par une phosphopantéthéinyl transférase (PPTase). Le détail de cette activation est décrit plus tard dans l'exposé (paragraphe 3 de ce chapitre).

2. Le domaine d'activation qui permet la reconnaissance et l'activation spécifique du monomère à condenser.

3. Le domaine de condensation, qui assure le transfert du monomère activé sur l'oligomère.

2.2.1. Chaîne d'assemblage des composés NRP

Chez les NRPS, trois types de modules sont généralement observés [119]. La synthèse NRPS débute par un module d'initiation qui se compose au minimum d'un domaine d'adénylation (A) et d'un domaine de thiolation (PCP pour *peptidyl carrier protein*). Ensuite cette synthèse comporte « n » modules d'élongation qui se composent au minimum d'un domaine de condensation (C), d'un domaine A et d'un domaine T (Figure 9). Elle se termine enfin par un module de terminaison comprenant au minimum un domaine C, un domaine A, un domaine T et un domaine de thioestérase (TE) ou domaine de terminaison qui assure la libération de l'oligomère synthétisé (Figure 9).

2.2.2. Chaîne d'assemblage des composés PK

Les PKS sont composées au minimum, dans cet ordre, d'un domaine de condensation (KS), d'un domaine d'activation (AT) et d'un domaine de thiolation (ACP). À nouveau, le dernier module comporte un domaine de thioestérase (TE), qui assure la libération de l'oligomère néosynthétisé de la machinerie enzymatique. La structure modulaire générique des PKS est représentée dans la Figure 9. Les PKS sont divisées en trois familles (Type I, II et III) en fonction de leur mécanisme de fonctionnement et de leur organisation structurale [118].

2.2.3. Chaîne d'assemblage des hybrides PKS-NRPS

Les chaînes d'assemblage PKS-NRPS contiennent des modules enzymatiques PKS et NRPS, qui peuvent aussi coexister sur une même protéine, alors appelée hybride PKS-NRPS. Les produits

de ces synthèses hybrides sont alors composés à la fois de monomères issus du mécanisme des NRPS et de chaînes d'acides carboxyliques, issues du mécanisme PKS [115,118].

2.3. La logique chimique

Les NRPS et PKS fonctionnent comme des chaînes d'assemblage qui catalysent plusieurs réactions se découpant en trois phases (Figure 10) :

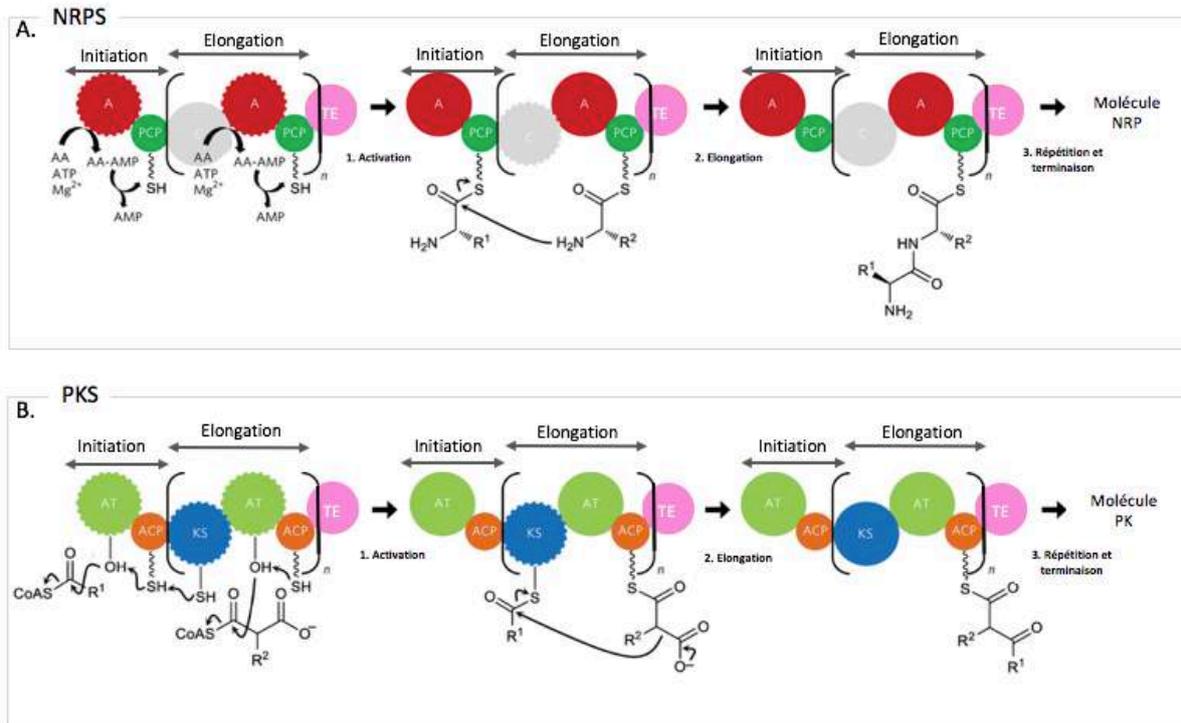


Figure 10. Cycles de biosynthèse des mégasynthèses PKS(A) et NRPS (B).

Le domaine actif de chaque étape est indiqué par une bordure crantée. La biosynthèse commence par l'activation des monomères grâce à une réaction d'adénylation avec de l'ATP, catalysée par le domaine A pour les NRP et grâce à une liaison thioester avec le coenzyme A (CoA), chargés par le domaine AT pour les PK. Ensuite vient l'étape d'élongation des oligomères, répétée n fois. La terminaison de la biosynthèse s'effectue grâce au domaine TE à activité thioestérase présent sur le module de terminaison. Des modifications peuvent se produire au cours de l'élongation par les domaines enzymatiques optionnels.

2.3.1. Activation des monomères ou initiation

L'utilisation des monomères qui composent les PK et NRP, issus du métabolisme primaire, s'effectue après leur activation sous forme de thioesters [118]. Les composés PK sont constitués de monomères d'acides carboxyliques, alors que les NRP sont synthétisés à partir des 20 acides aminés protéinogènes, d'acides aminés non protéinogènes et d'acides aryles. Plus de 500 monomères différents sont dénombrés et à l'origine de la diversité des composés NRP. Les monomères activés des PK et des NRP sont ensuite chargés sur les domaines de

thiolation ou domaines porteurs, pour former respectivement des acyl- et des aminoacyl-thioesters conservant leur énergie d'activation.

2.3.2. Élongation des oligomères

L'élongation de l'oligomère repose sur la formation d'une liaison covalente avec un monomère activé à chaque transfert de l'oligomère le long de la chaîne enzymatique d'assemblage. Ainsi, l'oligomère est transféré de la synthase n-1 sur l'acyl- ou l'aminoacyl-thioester. Ce processus est répété tout au long de la chaîne d'assemblage selon l'ordre guidé par l'agencement des mégasynthèses.

2.3.3. Modification des oligomères

L'oligomère peut être modifié sur la chaîne d'assemblage multienzymatique au cours des différentes phases d'élongation ou après celles-ci. Ces modifications sont assurées au cours d'élongation par les domaines optionnels des mégasynthèses. Des enzymes discrètes, fréquemment codées dans le cluster comprenant les gènes des mégasynthèses peuvent également modifier l'oligomère au cours de sa synthèse ou de son assemblage.

3. Activation des PKS et NRPS par les Phosphopantéthéinyl transférases

Comme précédemment décrit, les PKS, NRPS et PKS/NRPS sont toutes caractérisées par la présence d'un domaine porteur (ACP ou PCP selon le type de mégasynthase) qui doit être activé pour que ces enzymes soient fonctionnelles. Cette activation est une modification post-traductionnelle réalisée par une enzyme appelée phosphopantéthéinyl transférase ou PPTase. Une partie de mon introduction se concentre sur l'activation des domaines porteurs par ces enzymes.

Les PPTases constituent une superfamille d'enzymes essentielles pour la viabilité cellulaire dans les trois domaines de la vie : les bactéries, les archées et les eucaryotes. Elles sont requises pour la synthèse de nombreux composés variés tels que les acides gras, les polycétides et les peptides non-ribosomiaux [120]. L'activité des PPTases consiste en

l'activation des domaines porteurs de systèmes enzymatiques impliqués dans la voie de biosynthèse de ces composés.

3.1. Les domaines porteurs

Les domaines porteurs (ou CP pour *carrier protein*) représentent une grande famille de petites protéines globulaires (environ 70-100 acides aminés) interagissant avec plus de 30 partenaires, incluant les enzymes du métabolisme primaire et secondaire [121]. Ces protéines peuvent faire partie intégrante des mégasynthèses multimodulaires ou bien exister en monomères. Leur rôle est de transférer le composé en cours d'élongation d'une mégaenzyme à l'autre [121], et doivent ainsi interagir avec tous les domaines catalytiques présents dans le même module aussi bien qu'avec le domaine suivant. Tous les domaines porteurs ont un résidu serine conservé qui requiert une 4'-phosphopantéthéinylation par une PPTase pour ancrer l'oligomère en cours de formation *via* un lien thioester flexible et labile. Chez les PKS et NRPS, ce domaine appelé domaine de thiolation, correspond au PCP (*peptidyl carrier protein*) pour les NRPS, et ACP (*acyl carrier protein*) pour les PKS. Pour les FAS (Fatty Acid Synthases), qui permettent la synthèse des acides gras, le domaine porteur est également appelé ACP. Les domaines porteurs délivrent les substrats à une multitude de partenaires protéiques, probablement par des interactions protéine-protéine spécifiques [122].

3.2. La superfamille des phosphopantéthéinyl transférases

La plupart des organismes vivants possèdent plusieurs PPTases : une PPTase dédiée à la biosynthèse des acides gras *via* l'activation des synthases FAS (Fatty Acid Synthase), et une ou plusieurs PPTases impliquées dans la biosynthèse des métabolites secondaires *via* l'activation des PKS et NRPS. Par exemple, chez *E. coli* la PPTase AcpS active le système FAS II alors que EntD active les domaines PCP et ACP des NRPS EntB et EntF de la voie de biosynthèse de l'entérobactine [120,123]. Cependant, certains organismes n'ont qu'une seule PPTase pour réaliser ces fonctions. Ainsi, chez l'homme, une seule PPTase monomérique de 329 acides aminés à large spectre de substrats a été mise en évidence [124].

L'AcpS (pour *holo*-ACP synthase) de *E. coli* est la première PPTase décrite par Lambalot *et al.* [123]. La comparaison de la séquence primaire de l'AcpS et de l'extrémité C-terminale du FAS2 de levure a permis de mettre en évidence la présence d'une séquence conservée de quelques

acides aminés entre les deux protéines. Récemment, l'analyse plus fine de cette séquence a permis d'aboutir à une nouvelle séquence consensus. Des alignements supplémentaires décrivent quatre signatures supplémentaires pour différentes sous-classes de PPTases de type I et II, cependant, la diversité de séquences primaires des PPTases font que les alignements de séquence et les analyses de BLAST restent difficiles à interpréter [120].

L'identification de cette séquence consensus a cependant permis la découverte de plusieurs autres membres de la famille tels que EntD de *E. coli*, Sfp de *B. subtilis* et Gsp de *B. brevis*. Depuis ces travaux, d'autres PPTases ont été mises en évidence et toutes possèdent cette courte séquence, constituant la signature de la famille. Au sein de cette signature consensus, six acides aminés sont particulièrement conservés (Figure 11).

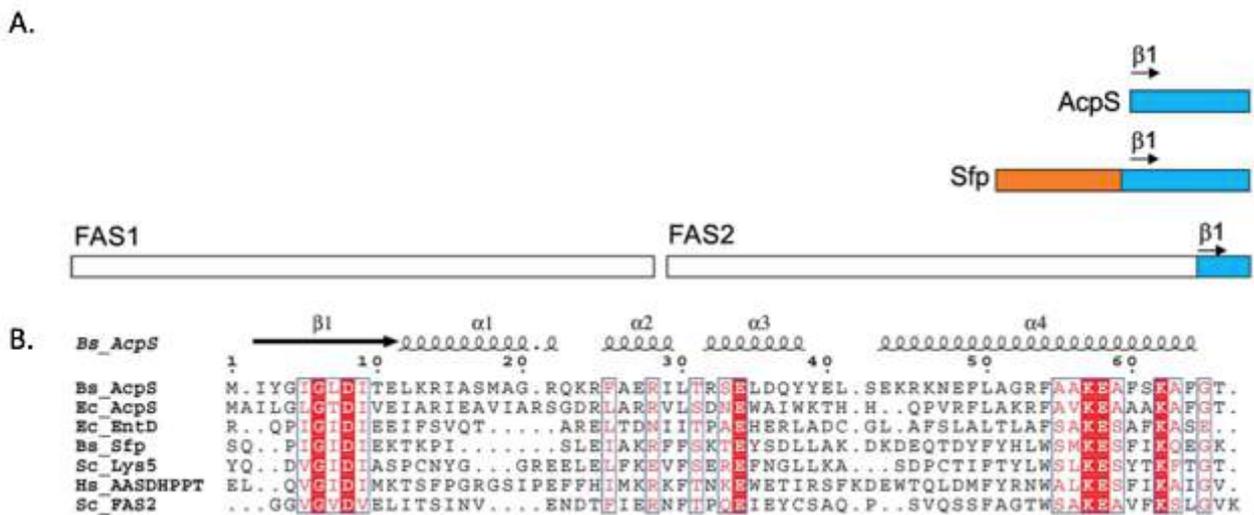


Figure 11. Les trois familles de PPTases.

A. Les types de PPTases : AcpS, Sfp et le domaine PPTase intégré dans le FAS2 de *S. cerevisiae*. B. Alignement des séquences conservées des PPTases. Les acides aminés hautement conservés sont en rouge. Bs, *B. subtilis*; Ec, *E. coli*; Hs, *Homo sapiens* et Sc, *S. cerevisiae*. D'après [120].

La superfamille des PPTases peut être divisée en trois, basé sur la conservation des séquences en acides aminés, sur leur structure tridimensionnelle et les synthèses cibles (Figure 11) :

- ⇒ **Les PPTases de type I ou PPTases de type AcpS** sont des protéines d'environ 120 acides aminés, souvent organisées sous forme de trimères. Elles activent généralement les systèmes FAS II (métabolisme primaire) bactériens, et dans certains organismes les PKS.

- ⇒ **Les PPTases de type II ou PPTases de type Sfp** sont des protéines monomériques d'environ 240 résidus dont l'exemple le plus étudié est la PPTase Sfp de *B. subtilis*. Elles activent généralement les enzymes impliquées dans la synthèse de métabolites secondaires, les PKS et NRPS, mais certaines PPTases de type II peuvent aussi activer les systèmes FAS (*e.g.* Sfp, Gsp). Si les gènes codant pour ces types de PPTase sont généralement positionnés à proximité, il existe aussi des cas où le gène de la PPTase est retrouvé loin des gènes codant pour le/les CPs associés, en dehors du cluster de gènes codant pour la synthèse. Par exemple le gène *entD* est situé dans le cluster de gènes permettant la synthèse de l'entérobactine [125]. Chez *E. coli*, cette PPTase est également responsable de l'activation de la biosynthèse de la yersiniabactine, synthétisée par l'îlot génomique HPI [126].
- ⇒ **Les PPTases de type III** correspondent à un domaine catalytique localisé au niveau de l'extrémité C-terminale du FAS2 cytosolique des levures. Ce domaine à activité PPTase catalyse l'auto-pantéthéinylation du FAS2 qui le porte [127].

3.3. Activité catalytique des PPTases

Les PPTases activent les domaines porteurs *via* une modification post-traductionnelle qui consiste en la fixation d'un groupement 4'-phosphopantéthéinyl (P-pant) provenant du Coenzyme A (CoA) sur une sérine conservée grâce à une liaison phosphoester établie avec le groupement -OH libre de l'acide aminé. Le domaine porteur passe alors de sa forme inactive *apo-* à une forme active *holo-* (Figure 12). La sérine modifiée est au centre d'une séquence consensus [Gx(D/H)S(L/I)] conservée entre les différents domaines porteurs. Le groupement P-pant ainsi fixé constitue un bras flexible de 20Å présentant un groupement thiol à son extrémité et qui sert de point d'ancrage aux intermédiaires réactionnels (acides gras, peptides) et permet leur présentation aux différents domaines ou sous-unités catalytiques des FAS, PKS ou NRPS [120,123].

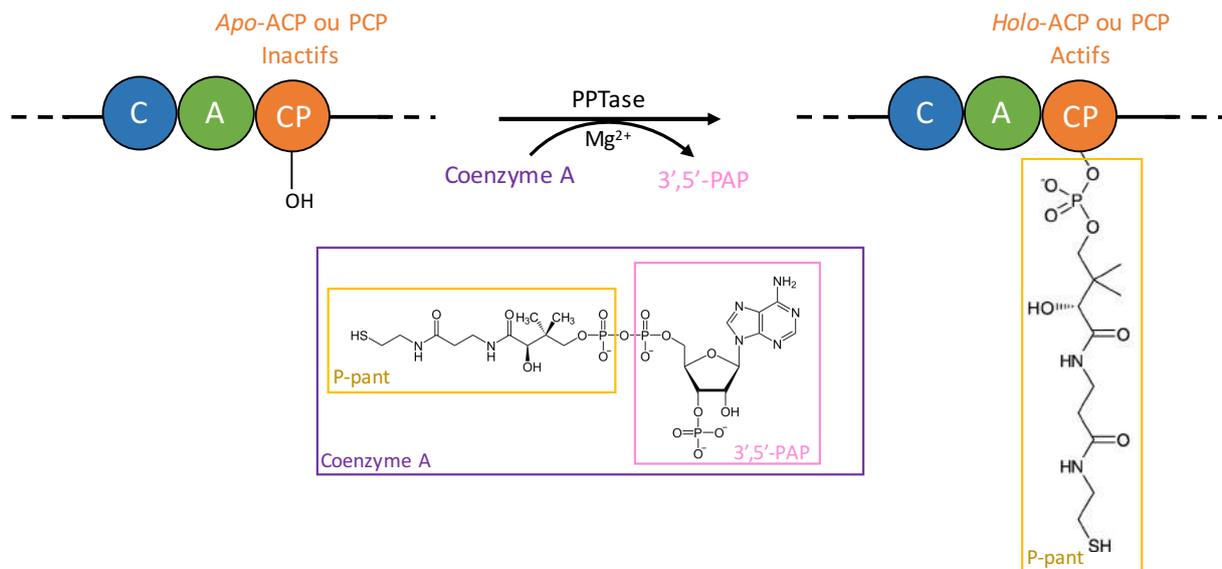


Figure 12. Activité catalytique des PPTases.

Les PPTases catalysent le transfert du groupement 4'-phosphopantéthéinyl (P-pant) du Coenzyme A sur une sérine des domaines ACP ou PCP. L'ACP ou le PCP ainsi modifié passe alors d'une forme inactive *apo*- à une forme active *holo*-. La réaction est dépendante de la présence de Mg^{2+} et entraîne la libération de 3',5'-ADP. Adapté de [120].

La manière dont une PPTase reconnaît un domaine porteur détermine sa spécificité et explique qu'une PPTase peut reconnaître jusqu'à vingt domaines porteurs différents, comme c'est le cas chez *M. tuberculosis*. La co-cristallisation de AcpS de *B. subtilis* avec le domaine ACP apparenté a permis d'élucider les interactions protéine-protéine mises en jeu [128]. Ainsi, le contact entre la protéine homotrimerique AcpS et l'ACP semble se faire entre l'hélice I de l'AcpS et l'hélice III de l'ACP. De même, les enzymes PPTases de type II semblent reconnaître les domaines porteurs T au niveau de boucles et d'une hélice adjacentes au site actif [129].

L'activité des PPTases est dépendante du pH. Et de manière générale, les PPTases sont plus actives à des valeurs de pH allant de 6.0 à 7.0 [130–132]. Par ailleurs, l'activité de toutes les PPTases requiert un ion Mg^{2+} pour le transfert du P-pant. L'étude publiée par Mofid *et al.* portant sur la capacité de Sfp à utiliser d'autres cations divalents montre que Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} et Ni^{2+} ne confère aucune activité PPTase à Sfp [133].

3.4. Structure des PPTases

Les séquences primaires des PPTases présentent peu d'identité de séquence [123]. En revanche, la structure tridimensionnelle de ces protéines est conservée [134,135]. La structure tridimensionnelle de Sfp montre une organisation fonctionnelle en deux domaines

pseudosymétriques [134]. La structure de la PPTase humaine, qui est une PPTase de type I, présente également cette organisation pseudosymétrique [136]. La comparaison de la structure de monomères d'AcpS de *B. subtilis* avec celle de la moitié C-terminale ou N-terminale de Sfp montre que chaque monomère d'AcpS peut être superposée avec chacune des moitiés de la protéine Sfp [134] (Figure 13).

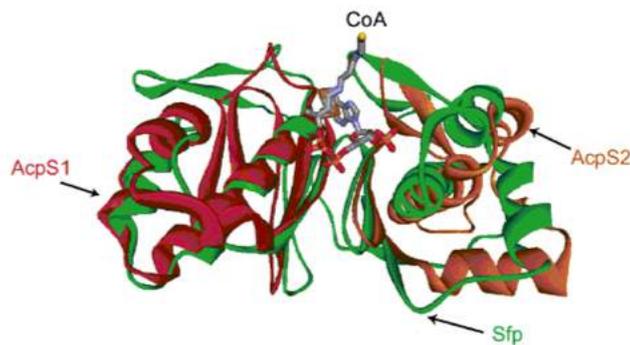


Figure 13. Superposition de monomères d'AcpS avec Sfp de *B. subtilis*.

Un monomère d'AcpS (AcpS2) est superposé avec l'extrémité N-terminale de Sfp. Un autre monomère (AcpS1) est superposé sur l'extrémité C-terminale. D'après [134].

Pour les protéines Sfp de *B. subtilis*, le site de liaison au CoA est localisé au niveau d'une cavité formée par deux domaines de la protéine. Dans le cas d'AcpS, ce site est retrouvé à l'interface entre deux homodimères [134,137]. L'étude du mécanisme réactionnel de Sfp a permis de mettre en évidence les dix acides aminés impliqués dans la liaison au CoA (K28, K31, T44, S89, H90, K155) et au Mg^{2+} (D107, E109, E151) [134]. L'interaction entre AcpS et le CoA met en jeu des acides aminés de chaque monomère [133].

Le domaine de liaison au PCP de Sfp est une boucle flexible. La flexibilité de cette région semble la raison de la grande variabilité de substrats de Sfp et des autres PPTases de type II. En revanche, sur la PPTase AcpS, le site d'interaction avec le substrat ACP est une hélice rigide qui ne s'adapte pas à la structure variée des différents domaines porteurs [120,133].

4. Les polycétides et peptides non-ribosomaux de *E. coli*

Chez *E. coli*, seuls quatre composés de type PK, NRP ou PK/NRP ont été décrits à ce jour : des sidérophores : l'entérobactine (NRP), les salmochélines (dérivés glycosylés de type NRP) et la yersiniabactine (PK-NRP), ainsi que la génotoxine colibactine (PK-NRP) [138,139].

4.1. Les sidérophores, des molécules impliquées dans l'acquisition du fer

Le fer est un élément fondamental pour la majorité des organismes vivants, procaryotes et eucaryotes [140]. Il est retrouvé sous deux états redox interchangeable, la forme réduite Fe^{2+} , appelée fer ferreux, et la forme oxydée Fe^{3+} , appelée fer ferrique. L'état du fer dépend de la teneur en oxygène et du pH de l'environnement où il se trouve. En absence d'oxygène (anaérobie) et à pH acide, le fer se retrouve principalement sous la forme réduite Fe^{2+} alors qu'en présence d'oxygène (aérobie) et à pH neutre, le fer se retrouve sous la forme oxydée Fe^{3+} [141]. La capacité du fer à facilement échanger des électrons fait du fer un cofacteur de choix dans diverses réactions biochimiques vitales telles que la photosynthèse, la fixation d'azote, la méthanogenèse, la respiration, le cycle de Krebs, le transport d'oxygène, la régulation génique et la synthèse d'ADN [142].

4.1.1. Acquisition du fer par les bactéries

Seules les bactéries lactiques *Lactobacillus*, le pathogène intracellulaire obligatoire responsable de la maladie de Lyme, *Borrelia burgdorferi*, et l'agent de la syphilis : *Treponema pallidum* sont connus pour leur indépendance vis-à-vis du fer [142,143]. En effet, ces bactéries utilisent par exemple le manganèse et le cobalt à la place de celui-ci.

En présence d'oxygène, le fer est sous forme ferreuse (Fe^{2+}), et relativement soluble (0,1 M à pH 7). Par contre, lorsque le fer est oxydé (Fe^{3+}) en absence d'oxygène, il est beaucoup moins soluble (10^{-9} M à pH 7) et sa biodisponibilité diminue. De même, sa liaison aux molécules de l'hôte le rend moins disponible (10^{-24} M) [144]. Puisqu'une cellule bactérienne a besoin d'une concentration de fer d'environ 10^{-6} M cela nécessite le déploiement de mécanismes d'acquisition spécialisés. Les deux mécanismes principaux sont l'extraction du fer associé à des molécules de l'hôte : la transferrine ou la lactoferrine, au travers de récepteurs extracellulaires [145–147] et la synthèse, la sécrétion et l'utilisation de sidérophores, capables de former des complexes avec le fer ferreux, grâce à leur très forte affinité pour celui-ci [148,149]. Il existe aussi d'autres stratégies moins communes comme la réduction de composés ferriques de faible solubilité en fer ferreux, plus soluble [150] et l'acquisition de fer hémique ou de protéines contenant des hèmes [151,152] (Figure 14).

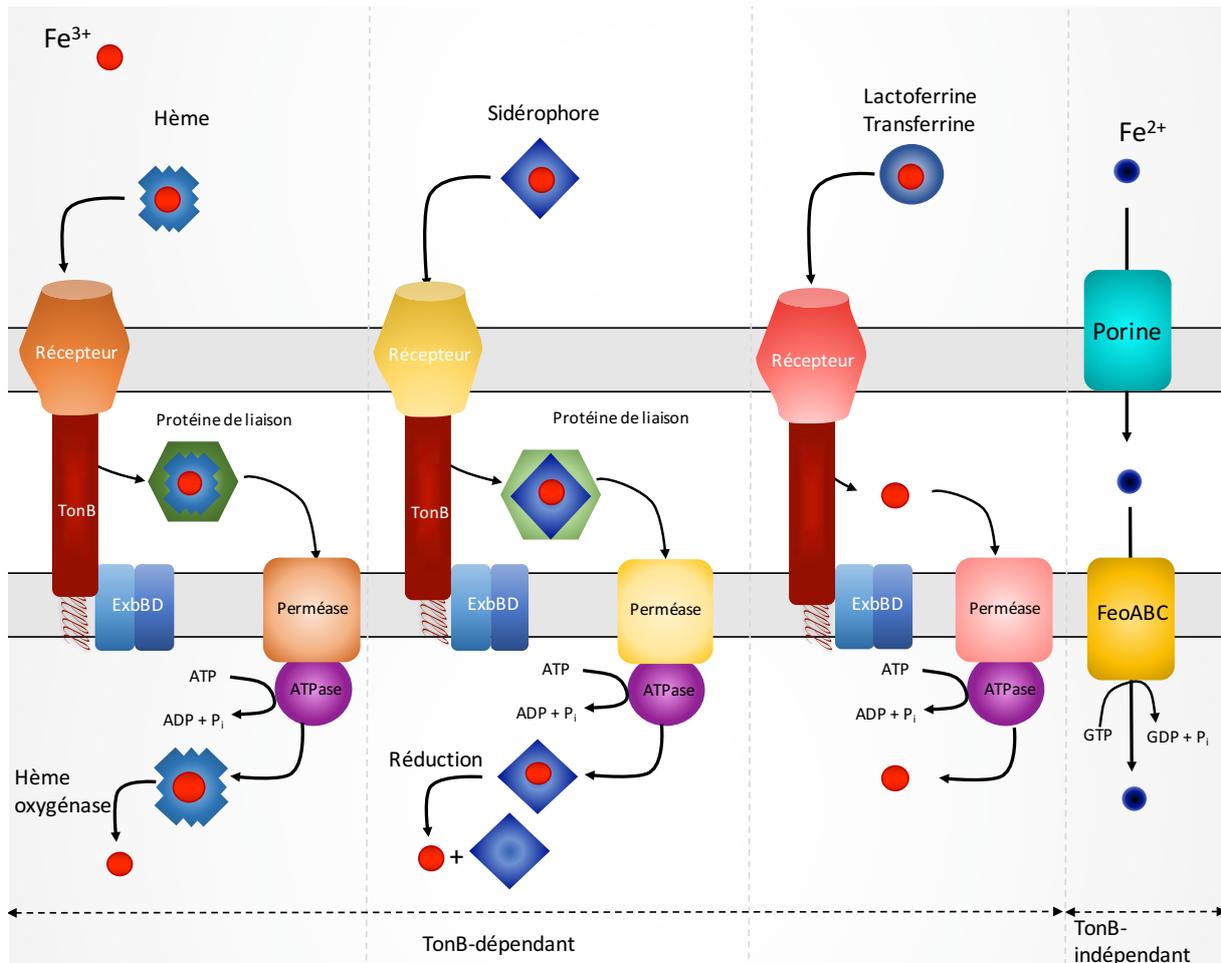


Figure 14. Systèmes d'acquisition du fer chez les bactéries à Gram négatif

Le transport passif du Fe^{2+} à travers la membrane externe se fait par diffusion passive au travers des porines, son transport actif à travers la membrane interne est assuré par le système FeoABC. L'énergie nécessaire à ce transport est issue de l'hydrolyse du GTP par FeoB. L'acquisition du fer via la transferrine/lactoferrine, l'hème et les sidérophores implique des récepteurs TonB-dépendants. L'énergie est fournie par le complexe protéique TonB-ExbD-ExbD de la membrane interne. Le transport au travers de la membrane interne implique généralement un transporteur ABC. L'énergie nécessaire à ce transport est fournie par l'hydrolyse cytoplasmique de l'ATP.

4.1.2. Acquisition du fer via les sidérophores

4.1.2.1. Généralités

Les sidérophores sont synthétisés par les bactéries, les champignons et certaines plantes, lorsque la concentration en fer est limitante. Leur rôle est de solubiliser le fer afin de le rendre accessible à la cellule bactérienne. Ces petites molécules de poids moléculaire compris entre 400 et 1200 Da, ont une forte affinité pour le fer ferrique (Fe^{3+} , 10^{42} M^{-1} pour l'entérobactine par exemple) [148,149]. Ils sont sécrétés dans le milieu extracellulaire et vont lier le fer qui est lié aux molécules de l'hôte ou de l'environnement. Jusqu'à présent, plus de 500 sidérophores ont été caractérisés chimiquement [153,154]. La plupart de ceux-ci ont été classés en trois

grandes familles selon les groupements fonctionnels servant à chélater le fer : les hydroxamates, carboxylates et les catécholates [153,155]. Cependant, la découverte de nouveaux sidérophores, intégrant les caractéristiques d'au moins deux classes en une seule molécule, conduit à une classification plus complexe (Figure 15).

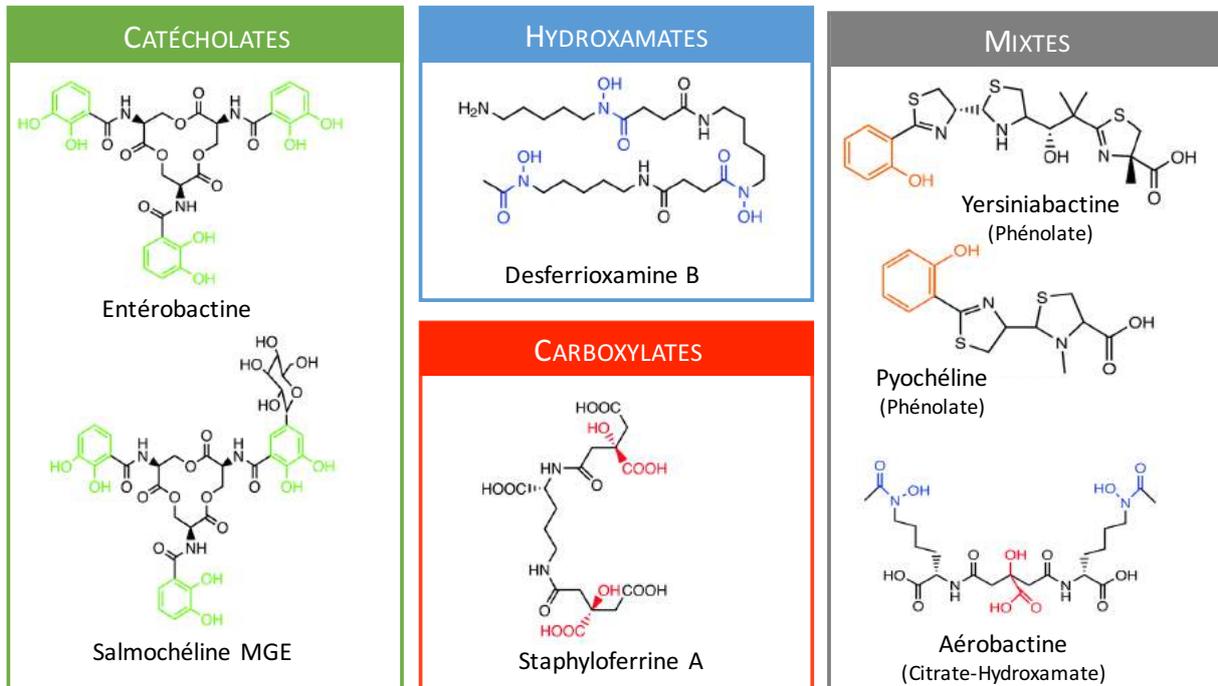


Figure 15. Les différents types de sidérophores.

Les sidérophores sont divisés en trois familles principales, les catécholates, les hydroxamates et les carboxylates. Les sidérophores mixtes sont des sidérophores qui ont au moins deux éléments de familles de sidérophores différentes. Les groupements impliqués dans la complexation au fer ferrique sont en couleur.

Selon le nombre de groupements qui servent à la formation du complexe stable entre le sidérophore et le Fe^{3+} présents par molécule de sidérophore, la chélation du fer se fera avec une stœchiométrie fer/sidérophore de 1 :1, 2 :1 ou 3 :1 [156,157].

Presque toutes les souches de *E. coli*, ainsi que de nombreuses entérobactéries synthétisent l'entérobactine, un composé NRP de type catécholate [153]. Certaines souches de *E. coli* (principalement du groupe phylogénétique B2) peuvent produire trois sidérophores additionnels : les salmochélines (dérivés glycosylés de l'entérobactine), la yersiniabactine (PK-NRP) et l'aéro bactéline (de type citrate/hydroxamate, PKS-NRPS indépendant).

4.1.2.2. Les différentes étapes d'acquisition du fer par les sidérophores

Malgré les différences chimiques existantes entre les différents sidérophores, les étapes d'acquisition du fer par ces molécules restent similaires. Ainsi l'acquisition du fer par les

sidérophores se découpe en 5 étapes : (1) La biosynthèse, (2) L'export, (3) La capture du complexe fer-sidérophore par un récepteur membranaire, (4) L'internalisation et (5) La libération du fer dans le cytoplasme. Ces étapes sont représentées dans la Figure 16

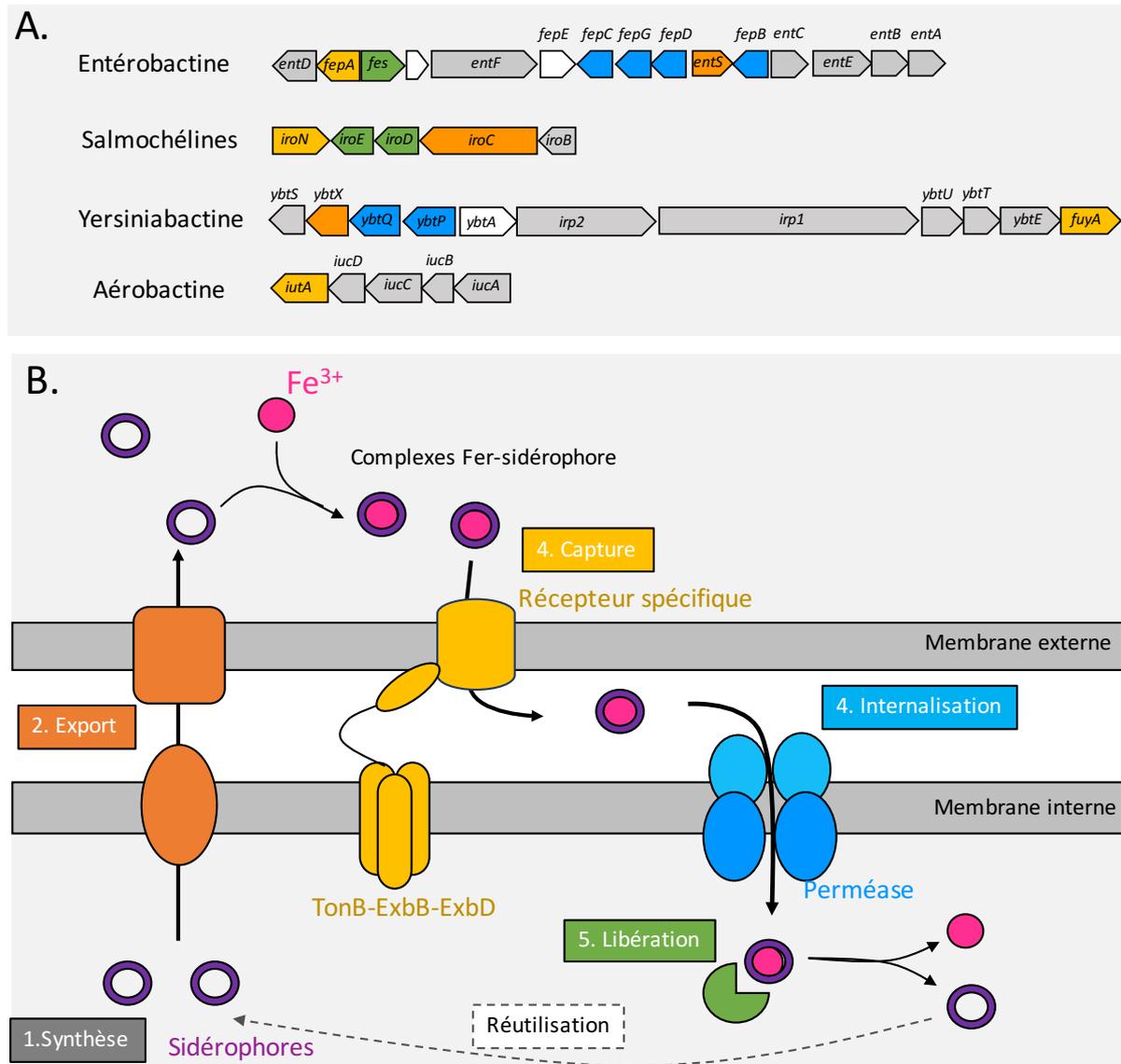


Figure 16. Organisation génétique des clusters codant les sidérophores (A) et les étapes de l'acquisition du fer par les sidérophores (B). Adapté de [158].

(1). Biosynthèse des sidérophores

Il y a deux voies impliquées dans la synthèse des sidérophores : la voie dépendante des enzymes PKS et/ou NRPS et la voie qui ne dépend pas de ce type d'enzymes [138,157].

De manière générale, la biosynthèse des catécholates et phénolates requiert les machineries enzymatiques NRPS et/ou PKS (voir le paragraphe 2) [153]. La synthèse de l'entérobactine,

produite par *E. coli*, est synthétisées via la voie des NRPS. Les gènes codant pour les enzymes responsables de la synthèse des NRPS et/ou PKS sont généralement régulés par la protéine Fur (Ferric Uptake Regulator) (voir Chapitre III).

En revanche, les hydroxamates et les carboxylates sont, eux, assemblés de manière NRPS-indépendante, grâce à l'action d'enzymes telles que des monooxygénases, décarboxylases, aminotransférases, acyl- ou acétyl- transférases, ligases et aldolases [153,159]. La synthèse de l'aérobactine, un sidérophore mixte citrate-hydroxamate, s'effectue par ces voies de synthèse indépendamment des PKS et NRPS [160].

(2). Export dans le milieu extracellulaire

A l'issue de leur biosynthèse, la sécrétion des sidérophores dans le milieu extracellulaire est effectuée pas une protéine de transport ou une pompe. Il y a 3 principaux types de protéines impliqués dans ce processus : les MFS (Major Facilitator Superfamily), la superfamille des RND (*Resistance Nodulation and cell Division*) et les superfamilles des ABC transporteurs. Chez *E. coli*, l'entérobactine est exporté via une protéine MFS nommée EntS [161,162]. Les protéines de la superfamille ABC sont retrouvées par exemple chez *S. aureus* et *Mycobacterium smegmatis* [153].

(3). Capture des complexes Fer-sidérophores

Des récepteurs spécifiques localisés sur la membrane externe permettent la recapture des complexes fer³⁺-sidérophore. Ces récepteurs sont dépendants du système de transfert d'énergie TonB-ExbB-ExbD. Le complexe [ExbB-ExbD] utilise la force proton-motrice de la membrane plasmique interne pour transférer l'énergie à la protéine TonB. La liaison d'un complexe fer-sidérophore à son récepteur spécifique déclenche le recrutement de TonB, induisant alors un changement conformationnel du récepteur par transfert d'énergie et l'import périplasmique du complexe ferri-sidérophore [163]. Certaines bactéries sont dotées de récepteurs pour des sidérophores synthétisés par d'autres micro-organismes (sidérophore exogène ou xénosidérophore) et présents dans l'environnement [158]. Par exemple, *E. coli* peut utiliser le ferrichrome, sidérophore produit par le champignon *Ustilago sphaerogena* [153].

(4). Internalisation du complexe dans le cytoplasme

Chez la plupart des bactéries, l'internalisation du complexe fer³⁺-sidérophore depuis le périplasma jusque dans le cytoplasme au travers de la membrane interne s'effectue grâce à des ABC transporteurs ATP-dépendants (ferrichrome et ferri-entérobactine chez *E. coli*) ou des perméases (ferri-pyoverdine chez *P. aeruginosa*).

(5). Libération du fer du complexe Fer-sidérophore

La libération du fer du complexe fer-sidérophore est également différente selon les microbes et les types de sidérophores. Il existe cependant deux mécanismes principaux. Le premier (qui est aussi le plus utilisé) implique une réduction de la liaison fer-sidérophore par des réductases, le second implique l'hydrolyse du complexe. Cette hydrolyse conduit le complexe à une perte importante de stabilité qui par conséquent facilite le relargage du fer, soit par réduction soit par compétition avec une autre espèce chimique. La libération du fer des complexes fer-sidérophores formés avec l'entérobactine et les salmochélines nécessite l'action d'estérases capables d'hydrolyser le sidérophore [158]. Cependant, cette stratégie est limitée puisqu'elle est réalisable uniquement si le sidérophore a une structure hydrolysable qui permet une dégradation enzymatique. De plus, contrairement à la stratégie de réduction du complexe qui permet une réutilisation du sidérophore, intracellulairement pour le stockage du fer ou à nouveau dans le milieu extérieur pour chélater les ions Fe³⁺, l'hydrolyse conduit à la destruction du sidérophore.

4.1.2.3. Rôle des sidérophores dans la virulence

Les sidérophores, parce que ce sont de bons agents chélateurs de fer, participent à la virulence des bactéries pathogènes [153,158,164]. De plus en plus d'études démontrent leur rôle crucial dans la multiplication du pathogène (*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Y. pestis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. enterica*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*) et le développement de la virulence [165–173].

Dans les cellules hôtes, le fer extracellulaire est lié aux protéines de la famille des transferrines, vitales pour fournir le fer aux cellules du corps. Cette stratégie réduit la disponibilité du fer pour les bactéries pathogènes, participant ainsi au mécanisme de l'immunité innée, développée par l'hôte. Les sidérophores, grâce à leur grande affinité pour le fer, peuvent

rentrer en compétition avec les protéines de l'hôte pour le Fe^{3+} , élément critique pour la survie de la bactérie pathogène.

L'implication de l'entérobactine dans la virulence semble négligeable, notamment parce que l'entérobactine peut être séquestrée par la lipocaline-2 (ou NGAL pour *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*), une protéine de défense immunitaire de l'hôte [174]. Cependant, il semblerait que cette stratégie confère un avantage notamment lors d'une inflammation. En effet, une étude montre que l'entérobactine et sa forme monomérique, l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque, inhibent l'activité de la myéloperoxydase, une oxydoréductase active contre *E. coli*, en agissant comme « substrat suicide » [175]. Par ailleurs, certaines *E. coli* sont capables de synthétiser des dérivés glycosylés, appelés salmochélines, et qui ne sont pas reconnues par la lipocaline-2 [174]. Ainsi, IroB, la glycosyltransférase permettant la glycosylation de l'entérobactine participe à la virulence [176–179].

Le rôle de la yersiniabactine, synthétisée à partir de l'îlot génomique HPI (pour *High pathogenicity island*), dans la virulence a été démontré dans des modèles d'infections urinaires par *E. coli* [180–182]. Par ailleurs, une étude montre que YbtP et YbtQ, deux transporteurs ATP-dépendant synthétisée par l'îlot HPI, participent également à la virulence, puisque la mutation de ces deux transporteurs entraîne un défaut de survie dans un modèle d'infection urinaire murin [183]. L'implication de la yersiniabactine dans la virulence a également été montrée chez d'autres bactéries, comme par exemple chez *K. pneumoniae*, lors d'infections pulmonaires [167] ou encore chez *Y. pestis* dans des modèles murins de peste bubonique et pneumonique [170].

Quant à l'aérobactine, plus souvent synthétisée par les souches de *E. coli* pathogènes que par les souches commensales, son rôle a été démontré dans un modèle d'infection systémique chez le poulet [184], dans un modèle murin d'infection urinaire par *E. coli* et dans un modèle d'infection systémique par *K. pneumoniae* [185].

Selon l'environnement (pH, stress oxydatif, température ...), la production des sidérophores de *E. coli* est différente [186], de façon à ce que la bactérie s'adapte le mieux possible à son environnement, lors d'infection ou lors de la colonisation intestinale par exemple.

4.1.3. Acquisition du fer siderophores-indépendante

4.1.3.1. *Acquisition du fer ferreux*

Bien que très rare, le fer ferreux (en état d'oxydation, Fe^{2+}), en milieu anaérobie ou à pH acide, est directement utilisable par le micro-organisme, et ne requiert pas l'action d'un ligand ou d'un chélateur pour sa solubilisation et son transport dans la cellule (Figure 14). La majorité des espèces bactériennes possède à leur surface une réductase qui permet de réduire le Fe^{3+} [142,187], appelée Feo (*Ferrous iron transport*). Le transporteur du fer ferreux est codé par les gènes *feoA*, *feoB* et *feoC*, organisés en opéron appelé *feoABC*. Ces gènes sont induits par des conditions anaérobiques, et réprimés par le fer.

4.1.3.2. *Acquisition via la transferrine et la lactoferrine*

Chez certaines espèces pathogènes ont été identifiés des récepteurs à la transferrine et à la lactoferrine, deux glycoprotéines retrouvées dans le sérum et dans divers fluides extracellulaires, respectivement, permettent le transport du fer chez les mammifères. Les récepteurs de ces glycoprotéines sont localisés sur la membrane externe et leur expression est induite par une carence en fer [145,188]. Ces récepteurs, capables de discriminer le transporteur sous sa forme *apo-* (sans fer) ou *holo-* (avec fer) permettent la fixation de la forme *holo-* sur la membrane externe de la bactérie, puis la dissociation du fer et son import vers le périplasme (Figure 14). La prise en charge des transferrines ou lactoferrines liées au fer est Ton-ExbB-ExbD-dépendante. Le transport du fer, extrait des complexes fer-transporteur, à travers le périplasme est dépendant d'une protéine périplasmique (Fbp, *ferric binding protein*). Ensuite, le fer est pris en charge par une ABC perméase à travers la membrane cytosolique afin d'être conduit dans le cytosol [147].

4.1.3.3. *Acquisition via l'hème*

Chez l'homme, plus de 80% du fer est lié à l'hème ou aux hémoprotéines (protéines contenant comme groupement prosthétique une molécule d'hème, par exemple l'hémoglobine, la myoglobine, le cytochrome, ...) [151,152]. Dans l'intestin, l'hème alimentaire est disponible sous forme libre ou complexée à l'hémopexine.

Chez les bactéries à Gram négatif, deux systèmes majeurs de l'acquisition de l'hème ont été décrits. Le premier consiste en l'expression de récepteurs spécifiques de l'hème et/ou des

hémoprotéines à la surface de la membrane externe (Figure 14) [189]. Le second consiste en la synthèse d'hémophores, molécules analogues fonctionnelles des sidérophores qui ciblent spécifiquement l'hème [151]. L'énergie pour le transport de l'hème est également fournie par le système TonB-ExbB-ExbD [190]. Une fois que la molécule de l'hème a été transportée au travers du récepteur extra-membranaire, celui-ci est pris en charge par une protéine de transport de l'hème et délivrée au transporteur ABC qui permet le transfert de l'hème jusque dans le cytoplasme, de manière ATP-dépendante. Une fois entré dans la cellule bactérienne, celui-ci est séquestré par des protéines impliquées dans le stockage de l'hème, sa dégradation ou son transfert. Cette séquestration évite la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ou ROS pour *reactive oxygen species*), toxiques pour la bactérie. Chez *E. coli*, le système d'acquisition de l'hème, ChuA-Hma-DppABCDF, est spécifiquement associé aux *E. coli* du groupe phylogénétique B2 et il a été montré que ce système participe à la virulence de souches de *E. coli* uropathogènes [191,192].

4.2. La colibactine, une génotoxine bactérienne

La colibactine, identifiée en 2006 par mon laboratoire d'accueil, est un composé hybride de type polycétide-peptide non-ribosomal (PK-NRP), synthétisé par plusieurs espèces bactériennes de la famille des *Enterobacteriaceae*, dont *E. coli*.

4.2.1. L'îlot génomique *pks*

La colibactine est synthétisée par un îlot génomique de 54kb, l'îlot *pks*, comprenant 19 gènes de *clbA* à *clbS* [139] (Figure 17).

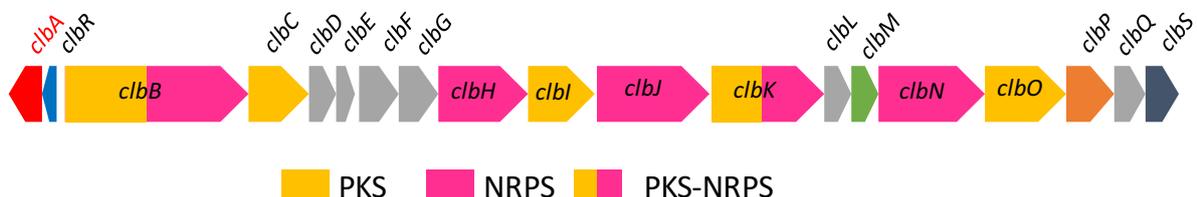


Figure 17. Organisation génomique de l'îlot *pks*.

L'îlot génomique *pks* comprend 19 gènes codant des PKS, des NRPS, des hybrides PKS-NRPS, des enzymes accessoires, ainsi qu'une pompe à efflux (ClbM), une peptidase (ClbP), une protéine de résistance (ClbS) et un régulateur putatif (ClbR).

L'îlot *pks* comprend 19 gènes codant une machinerie de biosynthèse de type PKS/NRPS ainsi que des enzymes et protéines accessoires. Ainsi, trois gènes codent des PKS (*clbC*, *clbI*, *clbO*), trois des NRPS (*clbH*, *clbJ*, *clbN*) et deux codent des PKS/NRPS (*clbB* et *clbK*). Le gène *clbA* code pour la PPTase, *clbM* code pour une pompe à efflux, *clbP* une peptidase périplasmique [193] (Figure 17). Le gène *clbR* code pour une protéine comportant un domaine de liaison à l'ADN et *clbS* code pour une protéine de résistance à l'activité génotoxique de la colibactine [194]. Les autres gènes (*clbD*, *clbE*, *clbF*, *clbG*, *clbL* et *clbQ*) codent des protéines accessoires [195,196]

4.2.2. Distribution de l'îlot *pks*

L'îlot génomique *pks* est retrouvé chez les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae*, telles que *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. koseri* et *E. aerogenes* [197,198], ainsi que d'autres protéobactéries, comme des bactéries vivant en association avec les éponges marines [199] ou les abeilles [200]. Chez *E. coli*, ce sont chez les souches du groupe phylogénétique B2 que l'îlot *pks* est retrouvé, et conservé à plus de 99% d'identité pour les séquences nucléotidiques. Il est alors intégré au niveau d'une région chromosomique située dans le locus ARNt *AsnW*, un site privilégié d'insertion et d'échange d'éléments d'ADN. Par ailleurs, l'îlot *pks* est systématiquement associé et inséré à proximité de l'îlot génomique HPI, îlot qui permet la synthèse de la yersiniabactine [197].

Concernant les souches commensales, la prévalence de l'îlot *pks* a été rapportée dans 38 à 58% des souches du phylogroupe B2. Chez les adultes sains des pays industrialisés, le portage de souches *pks* positives est d'environ 25% [197,198,201]. Ces souches colonisent le tractus intestinal des nouveau-nés dès la naissance, avec une prévalence allant de 15 à 18% (Nowrouzian and Oswald, 2012; Payros *et al.*, 2014). Les études épidémiologiques montrent que 40% des souches de *E. coli* responsables d'infections extra-intestinales (ExPEC) possèdent l'îlot *pks* [202]. La prévalence atteint 58% pour les souches responsables de bactériémies. Enfin, elle est de 59% pour les isolats d'urosepsis [201] et de 72% pour les souches ExPEC retrouvées dans les prostatites aiguës [202].

4.2.3. Biosynthèse de la colibactine

Si la structure complète de la colibactine reste encore inconnue, plusieurs études publiées récemment ont identifié de nombreux intermédiaires de biosynthèse [196,203,204,204–210]. Ces études suggèrent la présence non pas d'une, mais de plusieurs intermédiaires de biosynthèse qui peuvent être biologiquement actifs. Ainsi, il est probable qu'en réalité le terme de « colibactine » regroupe plusieurs molécules.

En premier lieu, la biosynthèse de la colibactine nécessite l'activation des mégasynthèses PKS/NRPS par la PPTase ClbA, qui est donc essentielle à la biosynthèse de cette molécule. Les mégasynthèses activées, celles-ci recrutent leurs monomères spécifiques. La première enzyme intervenant dans la synthèse est la NRPS ClbN, dont le substrat est l'asparagine (Asn) (Figure 18). C'est cette enzyme qui génère le N-myristoyl-D-asparagine, ou produit de clivage (*cf* étape de clivage). L'assemblage se poursuit ensuite avec l'intervention successive des enzymes ClbB-C-H-I-J-K qui utilisent divers substrats, conventionnels (malonyl-CoA, alanine, sérine, glycine, cystéine) ou non (acide aminocyclopropane-carboxylique), synthétisant la toxine sous forme de pré-colibactine. Une étude récente a identifié une « nouvelle » pré-colibactine, différente des autres intermédiaires de synthèse proposés jusqu'ici, suggérant deux voies alternatives de biosynthèse de la colibactine [196]. Le rôle de ClbL, clbO et ClbQ, trois enzymes essentielles à la synthèse de la colibactine, n'a pas encore été identifié.

Le métabolite résultant de la chaîne d'assemblage, c'est-à-dire une pré-colibactine inactive dont la structure complète reste inconnue, est exporté dans le périplasme *via* ClbM [211]. ClbM est une pompe à efflux insérée dans la membrane interne, dont la mutation induit une réduction de l'activité génotoxique de la colibactine (Figure 19). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que d'autres pompes à efflux complètent partiellement l'absence de ClbM [139,211].

Une fois dans le périplasme, la pré-colibactine est hydrolysée, ce qui entraîne la séparation de la colibactine active et le produit de clivage, ou N-myristoyl-D-asparagine. Cette réaction est effectuée par ClbP, une protéine ancrée à la membrane interne et possédant une activité D-amino-peptidase. Cette stratégie de pro-drogue pourrait être un mécanisme de protection de la bactérie qui produit ces composés génotoxiques. Cette stratégie a été décrite pour deux antibiotiques PK/NRP, la zwittermicine [212] et la xénocoumacine [213]. La mutation de *clbP*

entraîne l'absence d'effet génotoxique de la colibactine. Jusqu'à ce jour, l'ensemble des intermédiaires de synthèse a été identifié dans des souches mutées pour *clbP* [196,203,204,204–210].

Récemment, un second mécanisme de protection a été identifié, la protéine ClbS, qui protégerait la bactérie productrice de la colibactine, par séquestration ou modification des molécules de colibactine présentes dans le cytoplasme, suite par exemple à une ré-internalisation de ces molécules après l'étape de clivage par ClbP [194] (Figure 19).

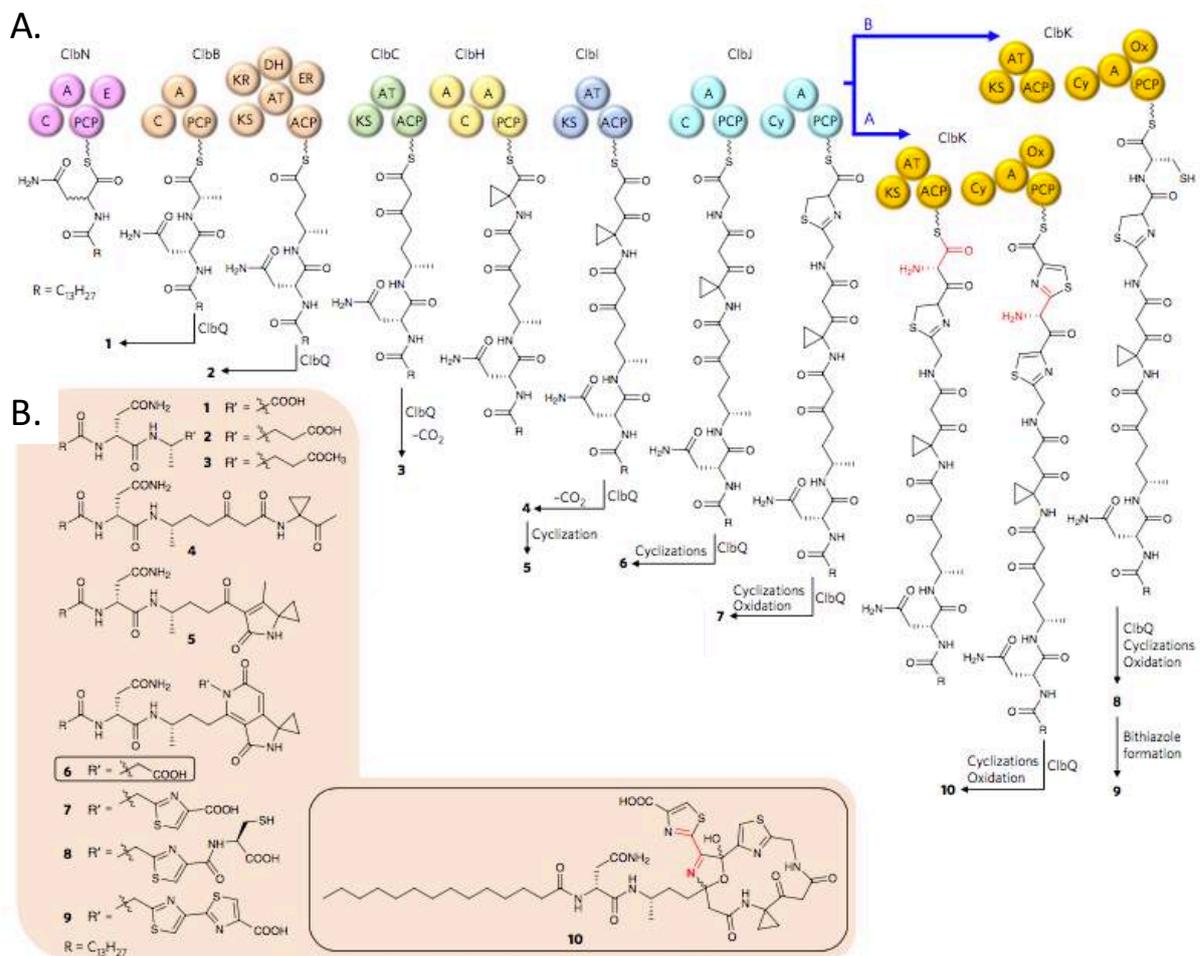


Figure 18. Structure et biosynthèse des précolibactines.

A. Biosynthèse de la colibactine et des différents intermédiaires de biosynthèse. Les deux voies possibles de la biosynthèse via ClbK sont représentées en bleu (A et B). Dans la voie A, une unité aminomalonyl-ACP (en rouge) est incorporée dans la molécule en cours d'élongation aboutissant à la formation du composé 10. Dans la voie B, cette étape n'existe pas, et aboutit directement à la synthèse des composés 8 et 9. B. Structures des différentes précolibactines proposées et reportées. D'après [196].

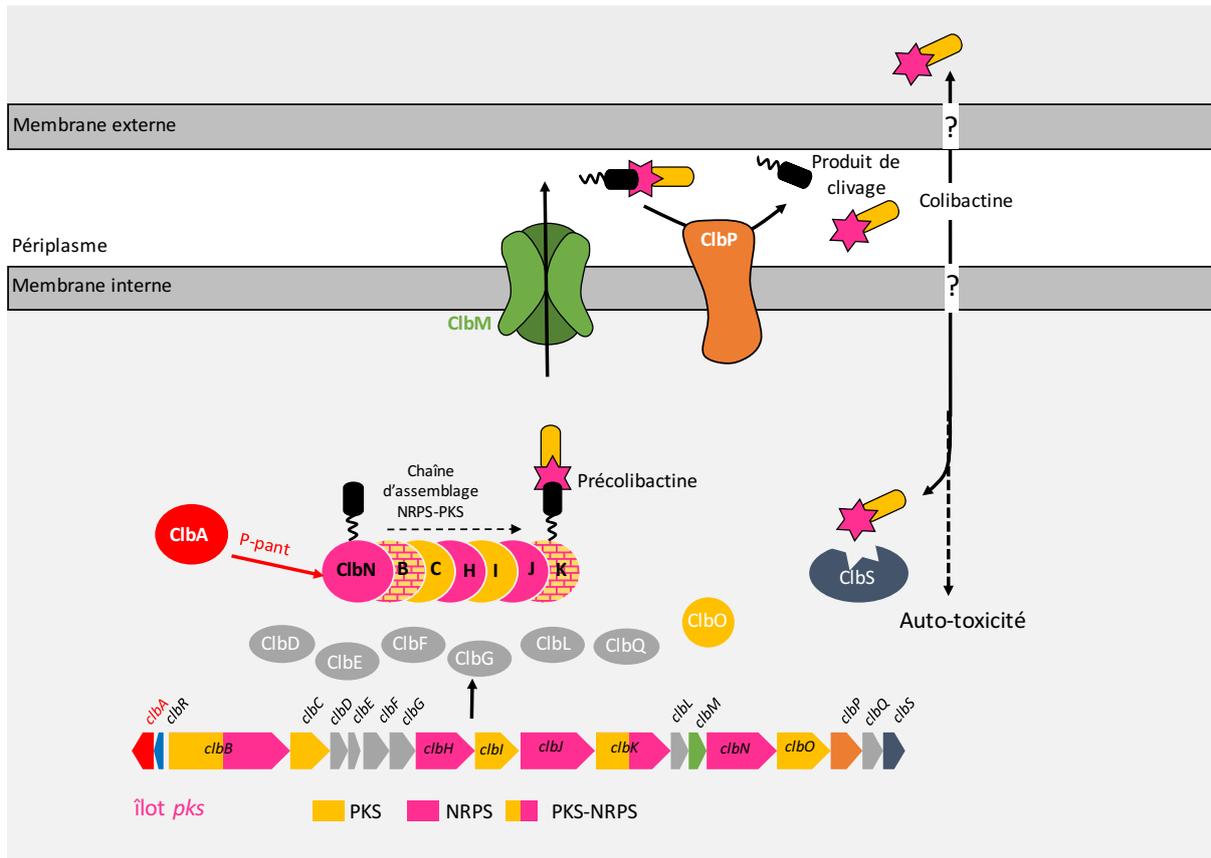


Figure 19. Modèle de la synthèse et de l'export de la colibactine.

L'activation de la chaîne d'assemblage se fait par ajout d'un motif P-pant sur le domaine porteur par ClbA. À l'issue de l'assemblage, une pré-colibactine inactive est synthétisée, puis transportée dans le périplasme *via* la pompe à efflux ClbM. Le motif prodrogue est ensuite clivé par ClbP et entraîne la libération de la colibactine active et du produit de clivage. ClbS est une protéine de résistance qui empêche une auto-toxicité dans le cas où la colibactine rentrerai sous sa forme active dans le cytoplasme. D'après [214].

4.2.4. Régulation de la colibactine

La protéine ClbR codée par l'îlot *pks* comporte un domaine de liaison à l'ADN comportant un motif hélice-tour-hélice [139]. Bien que la fonction de cette protéine de la famille LuxR soit inconnue, elle pourrait intervenir dans la régulation de l'expression des gènes de l'îlot.

Une étude s'intéressant à la régulation de l'expression des gènes de l'îlot *pks* avait été publiée en fonction des conditions de culture [215]. Ainsi, l'expression des gènes testés (*clbA*, *clbB*, *clbQ* et *clbR*) est influencée par la source de carbone, suggérant que la disponibilité des précurseurs nécessaires à l'assemblage de la colibactine, comme l'acétyl-CoA, pourrait réguler l'expression de ces gènes.

Récemment, il a été montré que deux protéines codées par le *core genome* de *E. coli* étaient

impliquées dans la régulation de la biosynthèse de colibactine [216]. En effet, la protéine chaperone Hsp90_{EC} et la protéase ClpQ pourraient réguler des gènes de l'îlot *pks* post-traductionnellement pour moduler la synthèse de la colibactine.

4.2.5. Activité de la colibactine

L'étude des intermédiaires de synthèse de la colibactine a révélé la présence d'un motif, appelé « ogive » ou « warhead », qui résulte du clivage de la prodroque [206,208,217]. C'est un motif spirocyclopropane électrophile très réactif, et similaire à ceux trouvés chez les métabolites secondaires alkylants de l'ADN, tels que les illudines, les duocarmycines ou la yatakémicine [218]. Ce motif semble être connecté à un groupement bithiazole, qui pourrait conférer des propriétés d'intercalation entre les brins d'ADN, comme c'est le cas pour les bléomycines et les phléomycines [210], suggérant que la cible de la colibactine pourrait être l'ADN. Cependant à ce jour, aucun adduit à l'ADN n'a encore été identifié.

4.2.6. Effets de la colibactine

4.2.6.1. *Effets génotoxiques*

La colibactine induit des cassures double-brin de l'ADN de cellules eucaryotes, résultant de l'interaction entre des bactéries la produisant et des cellules infectées [139]. Un surnageant de culture, un lysat bactérien ou des bactéries mortes n'induisent pas ce phénotype, l'interaction bactéries vivantes-cellules est donc essentielle. Les dommages à l'ADN provoqués par la colibactine aboutissent à l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN, impliquant la voie de signalisation ATM/chk2/cdc25. L'activation de cette cascade conduit ensuite à la phosphorylation de l'histone H2AX (ou γ H2AX) et à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Figure 20).

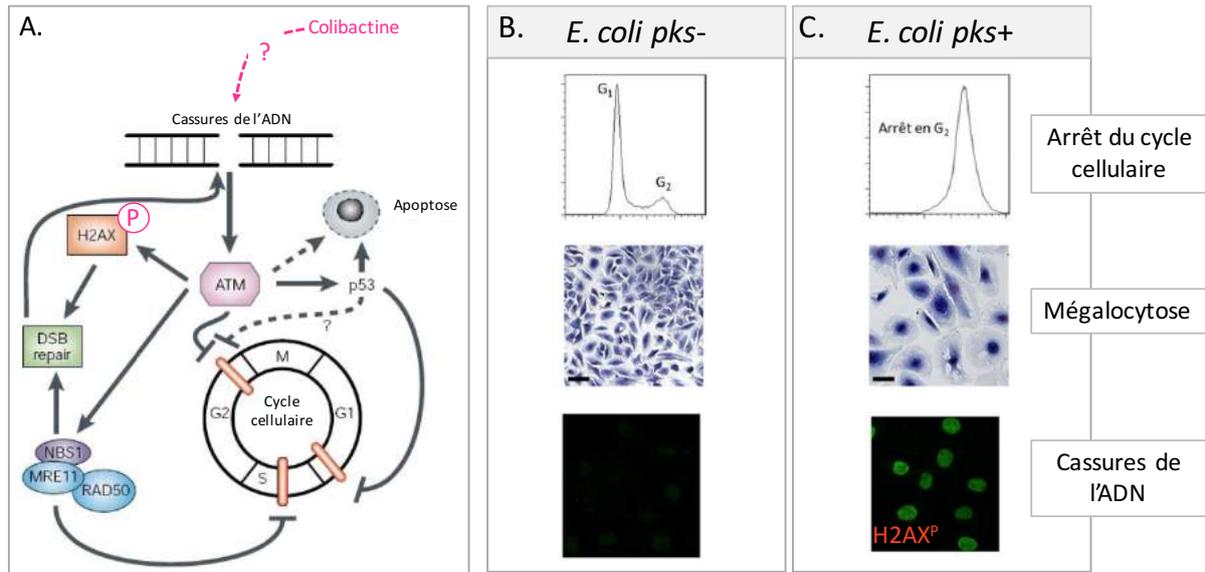


Figure 20. Effets de la colibactine sur les cellules eucaryotes.

A. La cascade de signalisation d'ATM en réponse à des cassures double brin active ATM. En aval, ATM active à son tour le complexe MRN, p53 et γ H2AX (l'histone H2AX phosphorylée). Effets observés suite à une infection de cellules eucaryotes avec des *E. coli pks-* (B) ou *pks+* (C). Les cellules eucaryotes infectées avec des *E. coli pks+* présentent un arrêt du cycle cellulaire à la transition G_2/M associé à une mégalocytose et à la présence de cassures de l'ADN.

Selon l'intensité de l'infection, trois phénotypes différents des cellules eucaryotes vont apparaître. Ainsi, une infection avec une petite dose de bactéries entraînera la réparation des cassures de l'ADN, puis la poursuite du cycle cellulaire. Cependant, une sous-population peut proliférer avec des dommages à l'ADN résiduels mais persistants, aboutissant au développement d'anomalies génétiques et à une instabilité chromosomique, pouvant conduire à la transformation oncogénique des cellules eucaryotes infectées [219]. Une infection modérée aboutira à une sénescence cellulaire prématurée, caractérisée par un élargissement cellulaire appelé mégalocytose, ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire. Ces cellules en sénescence sécrètent dans le milieu des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des facteurs de croissance, des ROS et des protéases. Ce phénotype de sécrétion associé à la sénescence (ou SASP, pour *senescent-associated secretory pattern*) induit par la colibactine peut favoriser la croissance de cellules tumorales par sécrétion de facteur de croissance hépatocytaire. Enfin, il résultera d'une infection à dose élevée, le déclenchement du phénomène d'apoptose.

4.2.6.2. Effets cancérigènes

Comme dit précédemment, les dommages à l'ADN induits par la colibactine sur les cellules intestinales peuvent aboutir à des mutations géniques et une instabilité chromosomique. Si le rôle de la colibactine dans le développement de cancers colorectaux n'est pas encore bien élucidé, il a tout de même été mis en évidence une plus forte prévalence des souches synthétisant la colibactine dans des biopsies digestives de patients atteints d'un cancer colorectal [220–222]. Par ailleurs, une étude a montré que dans un contexte inflammatoire, la colonisation intestinale par des souches produisant la colibactine peut contribuer au développement de cancers colorectaux [220]. Une autre étude montre que les bactéries produisant la colibactine favorisent la croissance tumorale en induisant le phénotype de sécrétion associé à la sénescence [223].

4.2.6.3. Effets sur l'homéostasie intestinale

E. coli colonise l'intestin dès les premières heures de la vie. Il a été montré dans un modèle de colonisation néonatale du tube digestif développé au laboratoire que les souches produisant la colibactine induisaient des dommages à l'ADN transitoires sur les entérocytes des rongeurs. Ceci se traduit par une instabilité chromosomique persistante [224]. Les animaux adultes colonisés depuis la naissance par des souches de *E. coli pks+* développent une altération de la barrière intestinale, et donc une augmentation de la réponse immunitaire aux antigènes de la lumière digestive, favorisant probablement l'apparition de manifestations allergiques ou auto-immunes [225].

De manière intéressante, l'activité probiotique de la souche Nissle 1917, utilisée comme traitement oral de nombreux désordres intestinaux chez l'Homme, est associée à la production de colibactine [226]. En effet, la mutation du gène *clbA* dans cette souche abolit ses propriétés anti-inflammatoires dans un modèle de colite chez le rongeur.

4.2.6.4. Rôle dans la virulence

Récemment, le rôle de l'îlot *pks* dans la virulence a été démontré dans un modèle de septicémie chez la souris avec une souche de *E. coli*, isolée d'une méningite néonatale [227]. Les résultats montrent que la colibactine est associée à une augmentation plus importante de la mortalité et de la lymphopénie. Ces résultats ont été confirmés dans un modèle rongeur d'infection systémique néonatale, où la mutation de la peptidase ClbP a été associée à une

diminution de la virulence [228]. De manière intéressante, la mutation de la PPTase ClbA entraînait une diminution de la virulence encore plus importante [228]. Ces résultats soulignent le rôle crucial de la ClbA, de par la connexion qu'elle établit entre les facteurs de virulence que sont la colibactine et les siderophores [126].

5. Les PPTases de *E. coli*

Chez toutes les souches de *E. coli*, quatre gènes codant des PPTases ont été identifiés : le gène *acpS*, *acpT* (*ECK3459*, *b3475*, *JW3440*, *yhhU*, *yhhU*), *entD* et *yieE* (*ECK3705*, *b3712*, *JW3690*) [120]. Certaines souches du groupe phylogénétique B2 de *E. coli* codent pour une PPTase supplémentaire, codée à partir de l'îlot génomique *pks*, et nommée ClbA.

AcpS, responsable entre autre de la phosphopantéthéinylation de FAS ACP (AcpP) [229], appartient à la famille de PPTases I. Si cette protéine trimérique de 28kDa est capable d'accepter comme substrat des domaines porteurs de certains polycétides, elle est avant tout impliquée dans l'activation des domaines porteurs des FAS (métabolisme primaire) chez divers organismes [120]. Par exemple, AcpS peut participer à la synthèse de polycétides tels que la frénolicine, la granaticine et la tetracénomycine chez *Streptomyces*. En revanche, elle est incapable d'installer un bras P-pant sur l'*apo*-EntF de l'entérobactine produite par *E. coli*, ou de l'*apo*-TycA, de la tyrocidine produite par *B. brevis* [123,125].

La PPTase AcpT est codée par un gène présent sur un îlot génomique de 138 gènes, pour la plupart impliqués dans la biosynthèse des acides gras [123,230]. Cette enzyme n'a pas encore été bien caractérisée, mais il semble qu'elle agisse sur deux domaines porteurs putatifs, Z4853 et Z4854, dont les gènes sont également codés par cet îlot. La protéine YieE est peu caractérisée, et son rôle précis n'est pas encore établi. Il semblerait néanmoins qu'elle fasse partie de la famille de PPTase de type II.

EntD et ClbA sont également deux PPTases de la famille de type II, présentes chez *E. coli*. Elles sont décrites ci-après.

5.1. La PPTase EntD de *E. coli*

Dans les années 90, Grossman *et al.* ont identifié les gènes impliqués dans la biosynthèse des sidérophores entérobactine et surfactine, chez *E. coli* et *B. subtilis* respectivement [231]. Ainsi ont été découvertes EntD, la PPTase impliquée dans la synthèse de l'entérobactine et Sfp, celle impliquée dans la synthèse de surfactine. Ces deux PPTases ont été groupées avec Gsp, impliquée dans la synthèse de gramicidine chez *B. brevis* [232]. Plus tard, une étude caractérisera la famille des PPTases de type II, dans lesquelles ces trois PPTases font partie [123].

L'entérobactine est codée à partir d'un segment de génome d'environ 22kb, composé de 14 gènes, dont le gène codant pour EntD, organisés en six opérons (Figure 21).

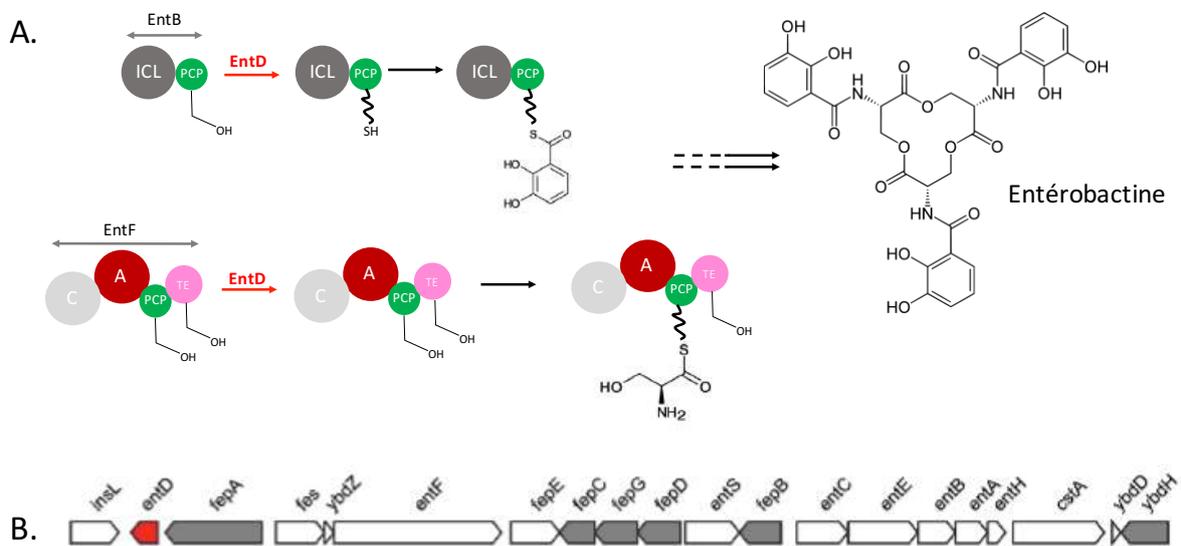


Figure 21. Biosynthèse de l'entérobactine et activation de EntB et EntF par EntD et groupes de gènes codant l'entérobactine.

(A) Biosynthèse de l'entérobactine. EntD active EntB et EntF. ICL représente la isochorismate lyase, PCP : peptidyl carrier protein, C : domaine de condensation, A : domaine d'adénylation et TE : Domaine thioestérase. (B) Groupe de gènes codant l'entérobactine. Adapté de [120].

EntD est la PPTase qui active les domaines porteurs EntF et EntB en catalysant leur phosphopantéthéinylation [123,125]. L'action de EntD sur ces domaines porteurs ne peut pas être complétée par AcpS, et inversement [233]. *In vitro*, elle semble néanmoins modifier le domaine porteur apo-AcpP de *E. coli*, mais avec une faible efficacité [123]. La spécificité de EntD pour les domaines porteurs ou pour des analogues de CoA n'a encore jamais été étudiée en détail. Néanmoins, Chalut *et al.*, ont observé que même si EntD participe à la synthèse d'un NRP (en activant les PCP de l'entérobactine), elle est également capable d'activer certains domaines porteurs des PKS (appelés ACP) chez *M. tuberculosis* [234]

5.2. La PPTase ClbA de *E. coli*

Certaines souches du groupe phylogénétique B2 ainsi que quelques entérobactéries telles que *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, and *C. koseri* synthétisent la colibactine, un hybride PK-NRP dont la structure est encore inconnue, produite à partir de l'îlot génomique *pks* [139]

La PPTase ClbA, impliquée dans la biosynthèse de la colibactine, est codée par le gène *clbA* présent dans l'îlot *pks*. Elle fait partie de la famille des PPTases de type II. Si la structure de ClbA n'est pas encore connue, la prédiction *in silico* de sa structure révèle que ClbA semble être une protéine dimérique (Figure 22).

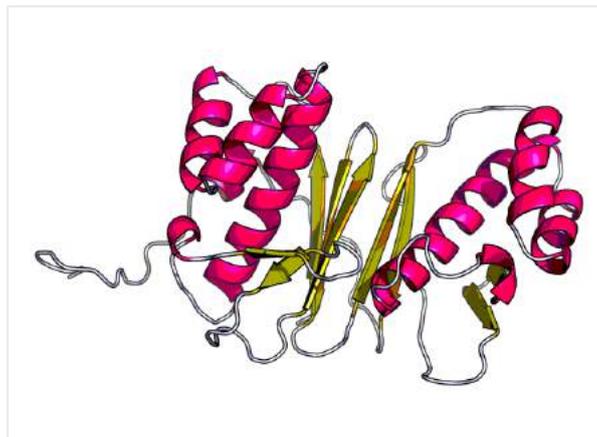


Figure 22. Prédiction de la structure tridimensionnelle de ClbA (RaptorX)

En plus de participer à la synthèse de la colibactine, ClbA peut également participer à celle de l'entérobactine, et de ce fait à celles des salmochélines, dérivés glycosylés de l'entérobactine [126]. Par ailleurs, certaines souches sont capables de synthétiser la yersiniabactine, un sidérophore codé par l'îlot génomique HPI (pour High pathogenicity island). Chez *Y. pestis*, la PPTase associée à la biosynthèse de la yersiniabactine est YbtD, mais elle n'est pas retrouvée chez *E. coli*. Il a également été montré par Martin *et al.* que ClbA, de même que EntD, participe à la biosynthèse de la yersiniabactine. Par ailleurs, *in vitro*, YbtD, Sfp et PptT activent la machinerie enzymatique de la colibactine. Ainsi, il est important de noter qu'une souche mutée pour *clbA* ne produira plus de colibactine, et pourrait également être altérée dans sa capacité à produire les sidérophores.

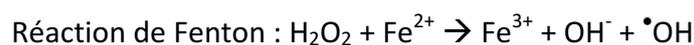
CHAPITRE III : RÉGULATION DE L'HOMÉOSTASIE DU FER

Le fer est à la fois un nutriment essentiel pour la croissance et le métabolisme des microorganismes, aussi bien que toxique dû à sa capacité à générer des radicaux libres (ROS, *reactive oxygen species*) via la réaction de Fenton [235]. Pour cette raison, la bactérie doit finement contrôler l'acquisition et le stockage du fer afin d'éviter une toxicité.

1. Détoxification et stockage du fer

1.1. Stress oxydatif

Lorsque le fer se trouve dans la bactérie, il est réduit en Fe^{2+} par des réductases. En présence d'oxygène, le fer ferreux catalyse différentes réactions menant à la production de radicaux oxygénés, cette réaction s'appelle la réaction de Fenton/Haber-Weiss et produit des ROS comme l'ion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et des radicaux hydroxyles ($\bullet OH$).



Le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont modérément réactifs physiologiquement, mais peuvent néanmoins être toxiques pour différents constituants de la cellule, comme l'ADN ou les protéines [236,237]. En revanche, le radical hydroxyle est très réactif et toxique pour la cellule, et peut causer des dommages importants à l'ADN, aux membranes lipidiques ou aux protéines, et aux centres [Fe-S] par exemple.

C'est ainsi que beaucoup de bactéries, et en particulier les bactéries aérobies et les pathogènes, ont développé différents mécanismes afin de résister aux ROS. Le mécanisme principal est la production d'enzymes capables de dégrader les ROS et leurs précurseurs afin de maintenir un niveau de stress tolérant. Ces enzymes incluent les superoxyde dismutases (SOD), les catalases, les alkylhydroperoxydases, les superoxyde réductases et les peroxydases.

La SOD catalyse la dismutation de O_2^- en H_2O_2 et O_2 . *E. coli* produit trois SODs : SodB, une SOD à fer cytosolique, SodA, une SOD à manganèse également cytosolique et SodC, une SOD à cuivre/zinc périplasmique [238].

1.2. Stockage

Afin d'éviter un contenu en fer libre intracellulaire trop élevé et prévenir ainsi la formation de ROS, celui-ci est stocké. Chez les bactéries, trois types de protéines responsables du stockage du fer cytoplasmique (ou ferritines) ont été décrites : les protéines Dps ou miniferritines, les ferritines et les bactérioferritines [238–240]. Dans tous les types de ferritines, le fer y est stocké sous sa forme ferrique. En effet, en entrant en contact avec la ferritine, le Fe^{2+} est oxydé en Fe^{3+} puis stocké au centre de la protéine. La réaction inverse se produit lorsque les bactéries ont besoin de ce fer stocké [240].

2. Régulation de l'homéostasie du fer

Nous l'avons vu précédemment, le fer est indispensable à la survie de la plupart des bactéries, mais est également toxique lorsqu'il est en trop grande quantité. Ainsi les bactéries ont développé plusieurs mécanismes régulant l'acquisition et le métabolisme du fer, afin de garder une quantité assez élevée pour subvenir aux fonctions essentielles mais limitée pour éviter des dommages des composants cellulaires. Deux régulateurs majeurs sont impliqués dans la régulation de l'homéostasie du fer : la protéine Fur (*ferric uptake regulator*) et le petit ARN non codant RyhB.

2.1. La protéine Fur

La superfamille de régulateurs de type « Fur » renferme environ 800 homologues chez les bactéries. Fur contrôle le métabolisme du fer chez la plupart des procaryotes, excepté chez certaines bactéries à Gram positif comme *Mycobacterium spp* et les Archeobactéries, dont l'homéostasie du fer est régulée par la famille de régulateur DxtR. Fur a ainsi donné son nom à une superfamille de senseurs (appelés métallorégulateurs) qui régulent la transcription de gènes connectés à l'homéostasie des métaux ainsi qu'à la réponse au stress oxydatif. On y

trouve par exemple Zur (acquisition du zinc), Mur (acquisition du manganèse), Nur (acquisition du nickel) et PerR (réponse au stress au peroxyde) [241].

2.1.1. Propriétés

Les protéines de la superfamille Fur ont la capacité de se lier spécifiquement à une séquence généralement riche en A/T, située couramment dans le promoteur de leur ADN cible, en utilisant un cofacteur-métallique. La coordination avec le cofacteur provoque un changement conformationnel qui induit et stabilise l'interaction avec l'ADN [241].

Le gène *fur* code pour une protéine homodimérique de 17kDa qui possède deux domaines et qui est capable de lier les métaux divalents (Figure 23). Le domaine C-terminal est important pour la dimérisation de la protéine et contient deux sites pouvant lier des métaux, alors que le domaine N-terminal permet à Fur de lier l'ADN au niveau des promoteurs de ses différentes cibles. La purification de Fur chez *E. coli* et *V. anguillarum* a permis de mettre en évidence la présence d'un atome de zinc dans chaque monomère, celui-ci servant à stabiliser la forme dimérique de la protéine [242].

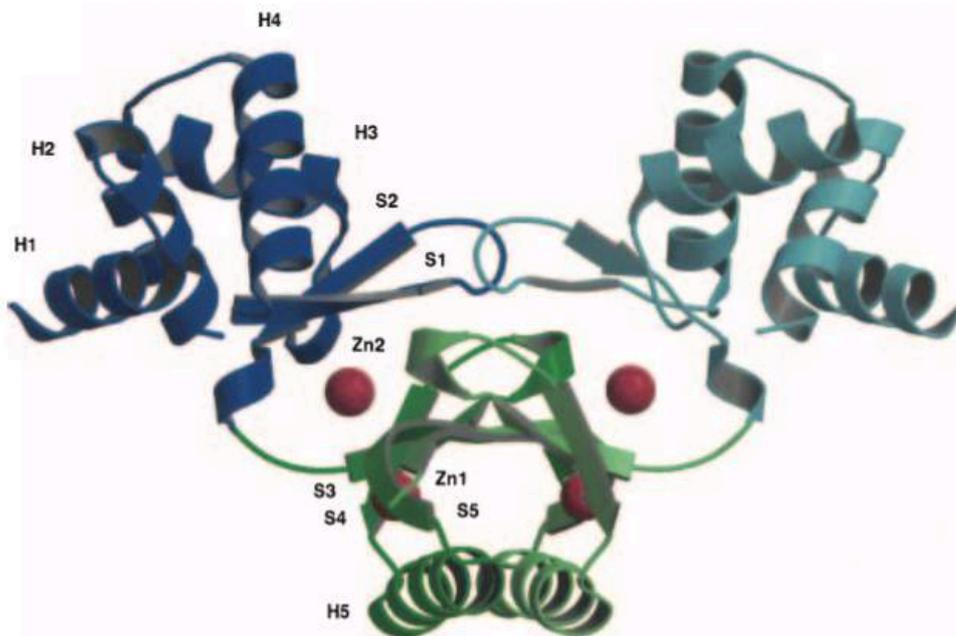


Figure 23. Structure cristallisée de la protéine dimérique Fur.

La protéine Fur contient quatre ions zinc (en rouge, deux en haut et deux en bas). Les deux ions zinc du haut permettent de maintenir l'intégrité structurale de la protéine. Les deux ions zinc du bas sont remplacés par du fer lorsqu'il y en a suffisamment dans le milieu [243]

Cependant, la liaison du zinc à la protéine Fur n'est pas retrouvée chez toutes les bactéries, par exemple chez *Pseudomonas aeruginosa* [244]. Le domaine C-terminal qui contient les sites de liaison aux métaux est capable, en plus de lier le Fe^{2+} , de lier d'autres métaux avec l'ordre d'activation suivant : $Zn^{2+} \gg Co^{2+} > Fe^{2+} > Mn^{2+}$. Cependant, seul le Fe^{2+} s'associe avec assez d'affinité pour activer ce régulateur dans les conditions physiologiques [245,246]. Le Mn^{2+} étant plus soluble et plus stable que le Fe^{2+} en solution aérobique, de nombreuses études *in vitro* ont utilisé cet ion divalent en tant que cofacteur [247].

2.1.2. Mécanisme d'action

Jusqu'à récemment, il était connu que lorsque la concentration intracellulaire de fer ferreux est élevée, un atome de Fe^{2+} se lie sur chaque monomère de Fur, entraînant son activation (la forme activée est appelée *holo-Fur*) et son changement de conformation, augmentant ainsi son affinité de liaison à l'ADN d'environ 1000 fois [140,142]. Le complexe Fur- Fe^{2+} s'apparie alors à l'ADN sur une région appelée Fur-Box (ou boîte Fur), généralement située dans la région du promoteur des gènes qu'il régule (entre les sites -35 et -10). Cette fixation bloque l'accès de l'ARN polymérase, inhibant ainsi les gènes en aval [238,248]. En absence de fer, Fur est inactive (appelée alors *apo-Fur*), et perd son affinité de liaison à l'ADN. Les gènes (par exemple ceux d'acquisition du fer) sont alors exprimés, puisque l'ARN polymérase peut à nouveau interagir avec les promoteurs. La Fur-box correspond à une séquence palindromique de 19pb dont la séquence consensus est 5'-GATAATGATAATCATTATC-3 [249,250].

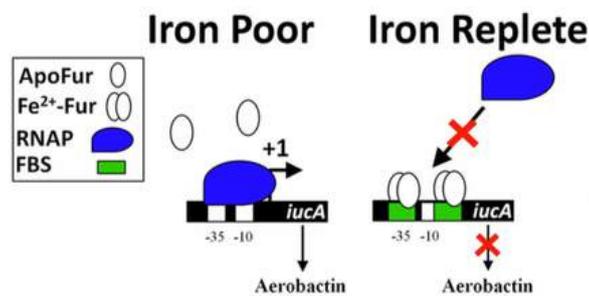


Figure 24. Modèle classique de répression des gènes par Fur.
D'après [251]

Le paradigme du mécanisme de Fur est maintenant remis en question, dans la mesure où des études démontrent que Fur peut également agir en régulateur sans présence de fer, ainsi que d'activateur pour certains gènes [250,251]. Des approches globales ont pu montrer par

exemple que les gènes codant la superoxyde dismutase SodB, la succinate déshydrogénase ainsi que la ferritine étaient régulés positivement par Fur [252].

Cette régulation positive peut se faire selon trois mécanismes différents [251] (Figure 25) :

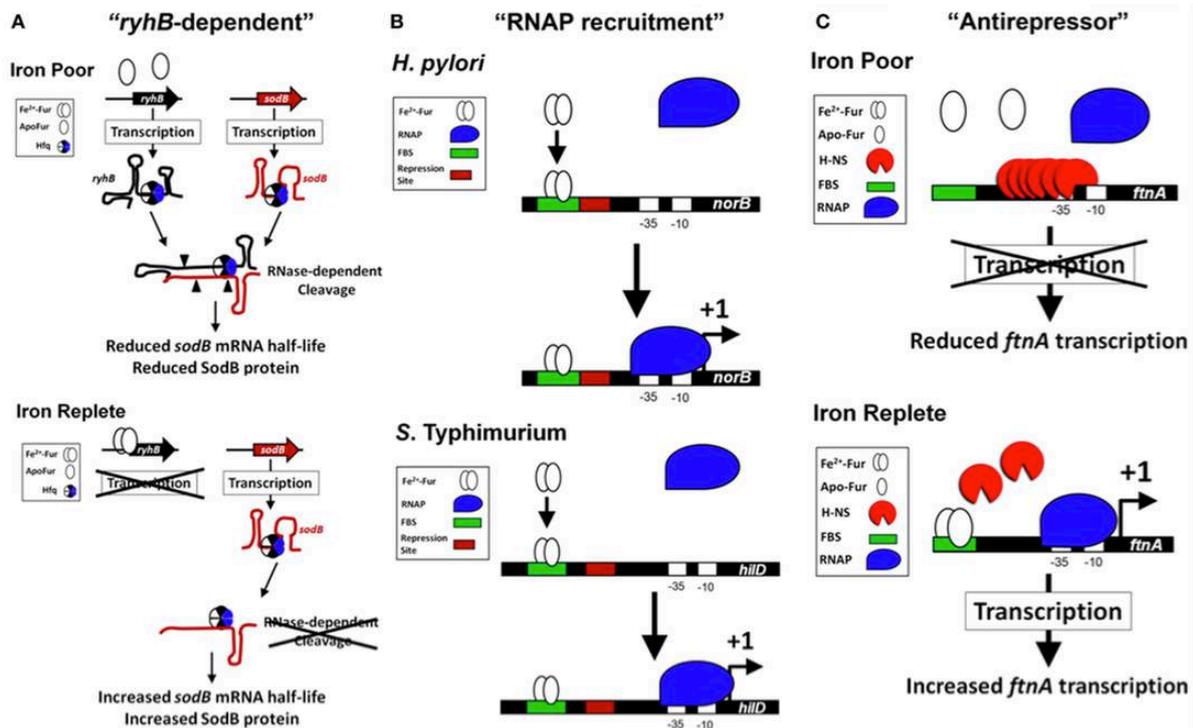


Figure 25. Modèles d'activation de l'expression des gènes *via* Fur
D'après [251]

A. Activation « RyhB-dépendante ». En conditions de carence en fer, Fur ne réprime pas la transcription du petit ARN RyhB (voir le paragraphe 2.2 ci-après), qui va dégrader son ARNm cible (*sodB* par exemple). En présence de fer, Fur bloque la transcription de *ryhB*, ce qui aboutit à une augmentation de la demi-vie de l'ARNm de *sodB*, et donc à la production de la protéine SodB (Figure 25A).

B. Activation via le recrutement de RNAP (RNA polymerase holoenzyme). La liaison de la protéine Fur active liée au Fe²⁺ au niveau d'une Fur-box favorise la liaison de l'ARN polymérase sur le promoteur et donc la transcription du gène cible. Ceci a par exemple été montré pour les gènes *norB* chez *H. pylori* et *hilD* chez *S. typhimurium*, deux gènes impliqués dans la virulence (Figure 25B).

C. Mécanisme d'anti-répression. Comme cela a été décrit pour le gène *ftnA* codant la ferritine chez *E. coli*, en présence de fer, le répresseur H-NS se lie en amont du gène *ftnA* et réprime sa

transcription [253]. Lorsque Fur est activée, le complexe Fur-Fe²⁺ se lie sur plusieurs Fur-box en amont du gène *ftnA*, ce qui empêche la fixation de H-NS sur le promoteur. Dans ce cas-là, Fur est requise pour bloquer la liaison de H-NS sur le promoteur et peut physiquement détacher H-NS en amont du site de régulation, permettant l'expression de *ftnA* (Figure 25A).

2.1.3. Régulon et rôles de Fur

2.1.3.1. *Acquisition du fer*

Les gènes impliqués dans la synthèse de sidérophores, et leur récepteurs spécifiques Cir, FecA, FepA, FhuA, FhuE et Fiu sont régulés par Fur [254]. De même, Fur contrôle l'expression des systèmes de transport ABC FecBCDE, FepBCDEFG et FhuBCD ainsi que les protéines de stockage du fer Bfr, FtnA et FtnB. Une récente étude à l'échelle du génome menée chez *E. coli*, a identifié de nouveaux gènes cibles. Ainsi Fur pourrait réguler de façon directe un total de 110 gènes cible compris dans 64 unités de transcription [250], ainsi qu'un total de 597 gènes régulés de manière indirecte.

2.1.3.2. *Virulence*

Fur régule également des gènes impliqués dans la virulence et la colonisation ainsi que le système de sécrétion de type III et la production de toxines [250,251,255–257]. Par exemple, l'inactivation de *fur* chez plusieurs pathogènes comme *P. aeruginosa*, *E. coli*, *V. cholerae*, *S. aureus* ou *H. pylori* conduit à une diminution importante de la virulence dans des modèles animaux d'infection [251]. Absente chez les organismes eucaryotes et essentielle pour la survie de la bactérie et les infections de l'hôte, Fur pourrait être considérée comme cible potentielle antibactérienne.

2.1.3.3. *Autres rôles*

Fur joue un rôle crucial dans la défense contre le stress oxydatif et le nitrogène, qui peuvent être imposés par l'hôte lors d'une infection. Par exemple, Fur permet une tolérance acide chez *S. typhimurium* et *H. pylori* [258,259], le contrôle de l'acquisition de la riboflavine chez *C. jejuni* [260] et le contrôle du stress osmotique chez *D. vulgaris* [261]. De plus, il a été démontré chez *Pseudomonas spp.* que Fur était impliquée dans la formation de biofilm mature [262] et dans la régulation du *quorum sensing* [263].

En conclusion, toutes ces données mettent en évidence le rôle central et complexe de Fur dans de nombreux métabolismes *via* la régulation de gènes impliqués dans différentes catégories fonctionnelles en réponse à différents stimuli.

2.2. Le petit ARN RyhB

Le petit ARN régulateur non codant RyhB de *E. coli* [264,265], est le régulateur post-transcriptionnel principal de l'homéostasie du fer.

2.2.1. Propriétés

RyhB est un petit ARN de 90 nucléotides dont le rôle initial est de réguler l'expression de gènes en réponse à la disponibilité en fer. En effet, en conditions riches en fer, le complexe Fur-Fe²⁺ réprime la transcription de *ryhB*, entraînant l'expression des gènes normalement réprimés par ce petit ARN. En conditions de carence en fer, la répression par Fur est levée, et RyhB réprime les gènes cibles. Ainsi, en inhibant la production de protéines non essentielles à la survie et liant le fer, RyhB permet aux protéines essentielles d'y avoir accès (Figure 26).

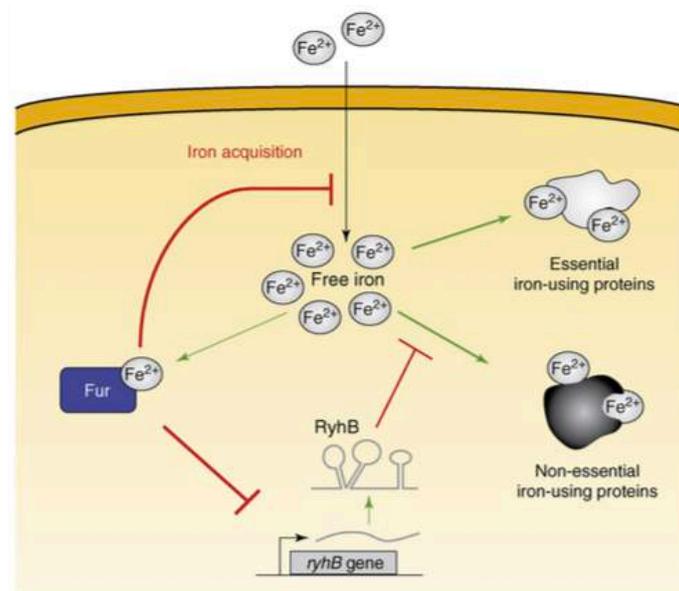


Figure 26. Régulation de l'homéostasie du fer par Fur et RyhB.

En présence de fer, Fur inactive l'expression des gènes d'acquisition du fer et l'expression de *ryhB*. En carence en fer, RyhB inhibe l'expression des gènes codant des protéines utilisatrices de fer, mais qui ne sont pas essentielles à la survie. Le fer est ainsi disponible pour les systèmes qui sont indispensables à la survie de la bactérie. D'après [266]

La transcription du gène *ryhB* produit un ARN possédant une structure secondaire repliée en tiges-boucles et incluant la structure de terminaison de la transcription ρ -indépendante commune aux petits ARN non codants [252,267,268] (Figure 27).

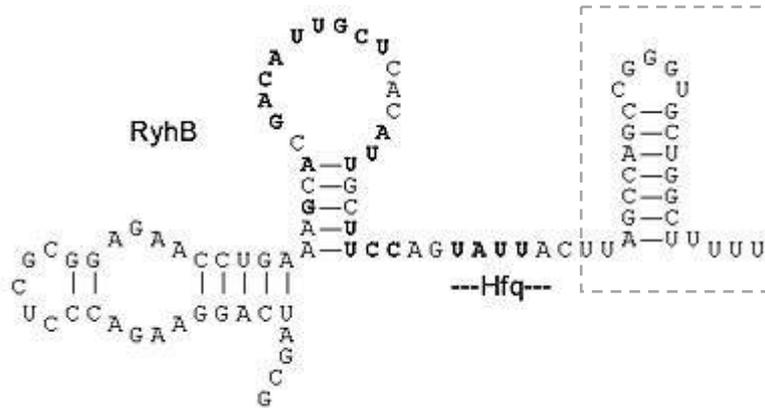


Figure 27. Structure secondaire du petit ARN RyhB.

Le petit ARN RyhB possède une structure secondaire repliée en tiges-boucles et une structure de terminaison de la transcription ρ -indépendante commune aux petits ARN non codants (encadrée en pointillés). La protéine Hfq se lie à la région riche en A et U comme indiqué. D'après [269]

Il agit en *trans* c'est-à-dire que la régulation est effectuée par un appariement antisens avec les ARNm, et possède une complémentarité limitée avec ses différentes cibles [270]. A ce jour, approximativement 20 ARNm cible de RyhB ont été identifiés.

2.2.2. Mécanismes d'action

RyhB peut agir selon quatre mécanismes différents décrits ci-après et schématisés dans la Figure 28.

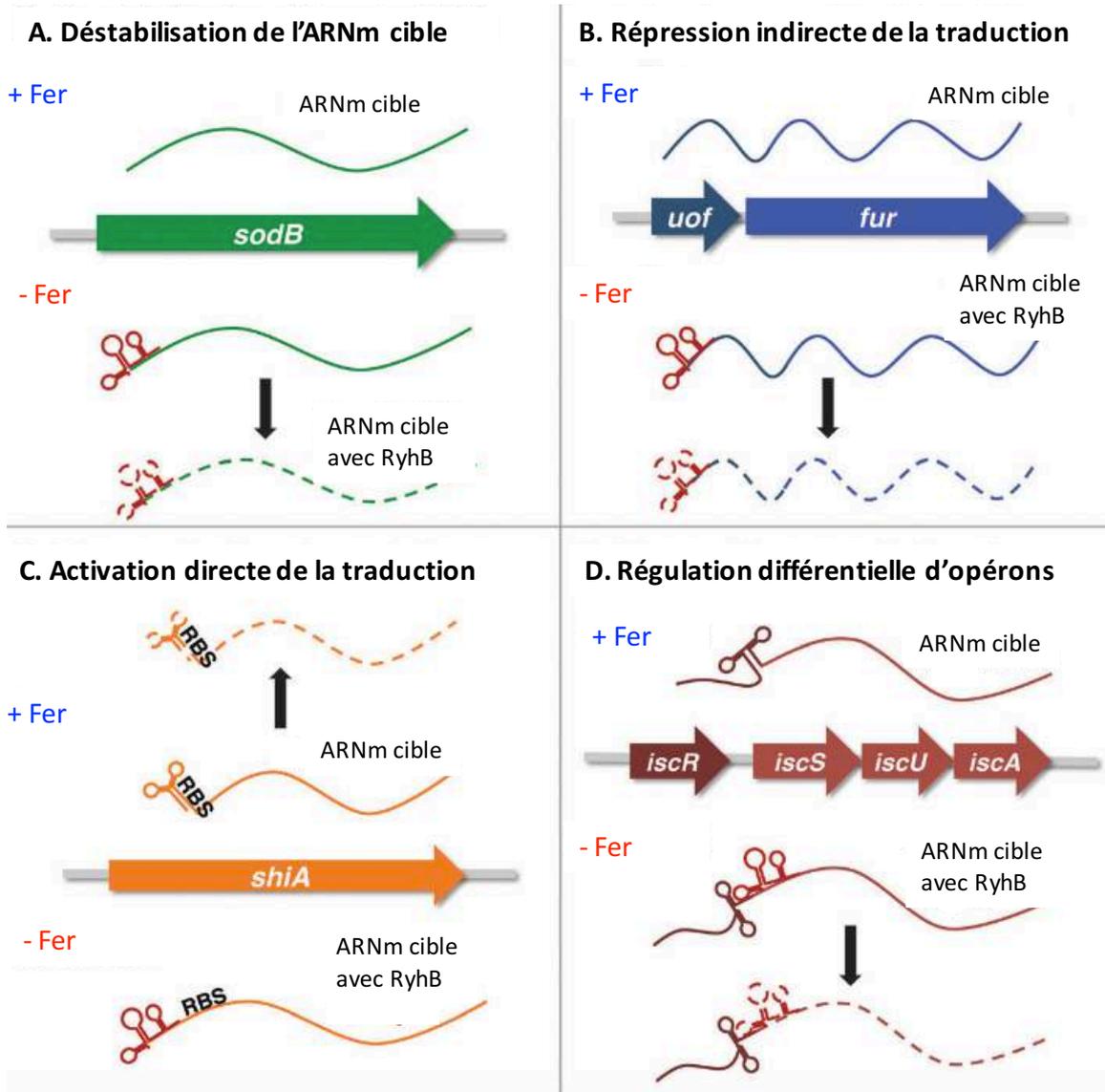


Figure 28. Représentation simplifiée des mécanismes d'action du petit ARN RyhB.

(A). RyhB peut s'apparier dans la région 5'UTR à l'aide de Hfq et entraîner la dégradation de l'ARNm cible via la RNaseE. (B). RyhB inhibe indirectement la traduction du gène *fur* en se liant au niveau de la région *uof*. (C) RyhB active la traduction en s'appariant dans la région 5'UTR de *shiA* et en empêchant l'ARN de former une structure inhibitrice. (D) RyhB régule différemment des gènes organisés en opéron. En s'appariant dans la région 5'UTR de *icsS*, RyhB induit l'inhibition de la traduction et la dégradation du transcrite *iscSUA*. Cependant, la structure secondaire présente à la fin du premier gène de l'opéron (*iscR*) le protège de l'action de RyhB et lui permet d'être traduit. Adapté de [268]

A. Déstabilisation de l'ARNm cible.

Le mécanisme le plus connu décrit que RyhB inhibe la traduction des différents ARNm, en diminuant la stabilité de ses transcrits et en favorisant leur dégradation. La régulation par RyhB est initiée par l'appariement anti-sens de celui-ci avec son ARNm cible le plus souvent dans la région 5'UTR, aux alentours de la région d'initiation de la traduction (TIR). Comme c'est le cas pour la plupart des petits ARN agissant en *trans*, la protéine chaperonne Hfq (*host factor*

for phage Q β) est généralement essentielle à cette étape, puisqu'elle aide à former et stabiliser le complexe RyhB-ARNm [252,271]. Hfq est une protéine décrite préalablement comme un facteur nécessaire pour la réplication du bactériophage à ARN Q β et est reconnue depuis comme régulateur important pouvant s'associer à l'ARN [272,273]. L'appariement avec Hfq permet à RyhB de bloquer la fixation du ribosome et d'inhiber la traduction. Cette répression traductionnelle est généralement suivie par la dégradation de RyhB avec son ARNm cible grâce au recrutement du dégradosome à ARN, complexe de protéines formé d'une endoribonucléase (RNase E), d'une polynucléotide phosphorylase (PNPase), d'une hélicase à ARN (RhlB) et d'une émolase [274]. La dégradation des ARNm et de RyhB peut également se faire par la RNase III [275]. La RNase E est la composante principale du dégradosome, puisqu'elle contient des sites de liaison pour toutes les protéines du dégradosome, pour l'ARN et pour Hfq [274]. Rapidement après l'appariement entre l'ARN et l'ARNm, elle dégrade simultanément les deux types d'ARN [276] (Figure 28A).

B. Répression indirecte de la traduction

Comme dit dans le chapitre précédent, RyhB peut également réguler son propre régulateur Fur [277]. En effet en amont du gène *fur* se trouve une petite ORF, appelée *uof* (*upstream of fur*), co-transcrite avec *fur*, et dont la fonction est principalement d'améliorer l'initiation de la traduction de *fur*. Grâce à son appariement avec *uof*, RyhB réprime la traduction de celle-ci, et donc réduit la traduction de *fur*. Cette répression résulte également d'une diminution de la stabilité de l'ARNm *uof-fur* [268,276,277] (Figure 28B). La régulation de *fur* par RyhB prévient l'accumulation de Fur en conditions pauvres en fer.

C. Activation directe de la traduction

En plus de réprimer l'expression de gènes, RyhB a aussi été démontré comme activant l'expression de certains gènes [278]. Ainsi, l'ARNm de *shiA*, codant une perméase du shikimate, précurseur de la synthèse de l'entérobactine, est directement régulé positivement. Dans ce cas, en conditions riches en fer, Hfq se fixe sur la région 5'-UTR de *shiA*, formant une structure secondaire inhibitrice qui restreint l'accès au RBS (*ribosome binding site*), et réprimant ainsi sa traduction. En condition de carence en fer, RyhB s'apparie avec l'ARNm et

désorganise la structure inhibitrice, activant la traduction de *shiA* et la stabilisation des ARNm et permettant l'augmentation de la production de la perméase et l'importation de shikimate (Figure 28C).

D. Régulation différentielle d'opérons

Enfin, RyhB peut promouvoir la régulation différentielle de gènes polycistroniques. En effet, c'est le cas pour le transcrit *icsRSUA*, qui code la machinerie requise pour la synthèse de centres [Fe-S]. Dans ce cas, RyhB se lie à la séquence complémentaire chevauchant le site de fixation du ribosome de *iscS*, aboutissant à la dégradation de la portion codant pour la synthèse de la machinerie des groupements [Fe-S] (*iscSUA*) (Figure 28D). La portion de l'ARNm de *icsR*, codant pour le régulateur transcriptionnel, est, elle, protégée de la dégradation par la présence d'une structure secondaire située dans la région 3' du transcrit. IscR nécessite un groupement [Fe-S] pour être actif, il est donc produit mais demeure sous forme *apo-IscR* [266]. Une telle régulation permet de bloquer la synthèse de centres [Fe-S] en absence de fer, tout en maintenant la production du régulateur transcriptionnel qui facilite alors la survie lors d'une carence en fer.

2.2.3. Régulon et rôles de RyhB

Le petit ARN RyhB est retrouvé chez plusieurs bactéries et certaines bactéries possèdent une deuxième copie de ce gène, comme *Salmonella*, *Klebsiella* et *Yersinia* [279]. De plus, certaines bactéries possèdent un ou plusieurs petits ARN ayant un rôle similaire à celui de RyhB, mais qui ne partagent pas d'homologie avec ce dernier. Par exemple, *Pseudomonas* possède deux petits ARN : PrrF1 et PrrF2, également impliqués dans la régulation de l'homéostasie du fer [280].

2.2.3.1. Régulation de l'homéostasie du fer

Le principal rôle de RyhB est de réguler l'homéostasie du fer. Lorsque le niveau de fer intracellulaire baisse, la répression de RyhB par Fur est levée et RyhB est exprimé (Figure 26). L'année après sa découverte en 2001, 6 ARNm cibles ont été découverts [252]. Ces gènes codent pour des enzymes du cycle TCA (*sdhCDAB*, codant pour la succinate deshydrogénase, *acnA*, codant pour une aconitase et *fumA* codant pour une fumarase), deux ferritines (*bfr* et

ftnA), et la superoxyde dismutase *sodB*. Cependant il a récemment été montré que *ftnA* était en réalité induit directement par Fur-Fe²⁺ et que cette régulation était RyhB-indépendante [253]. Une étude utilisant la technique des microarrays a, en plus de confirmer les cibles précédemment citées, identifié 18 autres transcrits, codant un total de 56 protéines, réprimés par RyhB [278].

La plupart de ces cibles sont impliquées dans le métabolisme du fer. Il a d'ailleurs été montré qu'une souche mutée pour *ryhB* avait jusque trois fois moins de fer Fe²⁺ intracellulaire comparé à une souche sauvage [281], et que la surexpression de RyhB entraîne une augmentation de 50% du fer intracellulaire. La majorité des cibles de RyhB associées au fer est importante pour le métabolisme du fer, mais elles ne sont pas essentielles pour la survie de la bactérie [266,282]. Donc, en situation de carence en fer, RyhB prévient l'expression de ces protéines non-essentiels afin que le peu de fer nouvellement acquis soit disponible pour les protéines essentielles à la survie de la bactérie (Figure 26). En résumé, RyhB inhibe des protéines qui ne sont pas indispensables lors d'une carence en fer mais qui sont néanmoins utiles lorsqu'il y a du fer (ferritine, superoxyde dismutase, synthèse des groupements [Fe-S]). Lorsque le fer diminue, ces protéines séquestrent inutilement le fer, donc leur répression par RyhB permet de conserver le fer pour qu'il soit incorporé dans les enzymes essentielles (ribonucléotide réductase, dihydroxyacide déshydratase).

2.2.3.2. Production de sidérophores

Des études récentes ont également montré que RyhB induit la production de sidérophores [281]. En effet, un mutant *ryhB* produit moins d'entérobactine que la souche sauvage en conditions pauvres en fer, notamment parce que les gènes *entCEBAH*, impliqués dans la synthèse d'entérobactine, nécessitent la présence de RyhB pour être exprimés. Par ailleurs, RyhB inhibe le gène *cysE*, qui code une serine acyltransférase qui utilise la sérine comme substrat pour la synthèse de la cystéine, ce qui entraîne une plus grande disponibilité en serine pour la synthèse d'entérobactine [281]. De plus, RyhB permet l'augmentation de la production des sidérophores, en activant la traduction de *shiA*, perméase du shikimate, précurseur du chorismate, utilisé comme substrat par l'enzyme EntC dans la première étape de la synthèse de l'entérobactine [283]. Enfin, chez une souche de *E. coli* pathogène responsable d'infections urinaires, RyhB contribue à la production de sidérophores, via l'activation de *shiA* et *iucD* (impliqué dans la synthèse d'aérobactine) et donc à la virulence de cette souche [248,250].

Enfin récemment, une étude a montré que RyhB1 et RyhB2, deux homologues partiels de RyhB présents chez *Salmonella enterica* stimulent la traduction de *iroN*, le récepteur de la membrane externe du complexe salmochéline-Fe³⁺ [284].

2.2.3.3. Régulation du métabolisme

RyhB est également impliqué dans la régulation du métabolisme de la bactérie, notamment en inhibant l'expression de gènes codant pour des enzymes du cycle de Krebs (une succinate deshydrogénase *sdhCDAB*, une fumarate réductase (*frdABCD*), une fumarase (*fumA*) et deux aconitases (*acnA* et *acnB*)) [252,278,285]. RyhB réprime aussi plusieurs gènes codant pour des composants de la chaîne respiratoire [286].

2.2.3.4. Réponse au stress oxydatif

RyhB est également impliqué dans la réponse au stress oxydatif. En effet, l'une des premières cibles découvertes de RyhB est *sodB* codant pour la superoxyde dismutase à fer [252], réprimé par RyhB en conditions de carence en fer. De plus, chez *E. coli*, RyhB inhibe l'expression du gène *msrB* codant pour une méthionine sulfoxyde réductase responsable de la réparation des dommages causés par les ROS aux protéines [287]. Cependant, récemment une étude montre que dans un modèle de colonisation du tractus urinaire murin par des *E. coli* pathogènes, RyhB ne semble pas impliqué dans la résistance au stress oxydatif [288].

2.2.3.5. Rôle dans la virulence

RyhB régule également des gènes impliqués dans la virulence chez les bactéries. En effet, il est par exemple requis dans la résistance aux pH acides chez *S. flexneri*, stress rencontré lors d'une infection [289]. Par ailleurs, RyhB inhibe l'expression de *virB* chez *S. dysenteriae*, gène codant pour un activateur de la transcription de plusieurs gènes de virulence qui affecte notamment l'invasion des cellules et la motilité [290,291]. Chez *K. pneumoniae*, RyhB régule la synthèse de la capsule polysaccharidique [292]. Et enfin, chez *Y. pestis*, la production de RyhB est activée lors de la croissance dans les poumons de souris, et semble faciliter la progression de la pneumonie chez la souris [293].

En conclusion, toutes ces données mettent en évidence le rôle central et complexe de RyhB dans de nombreux processus *via* la régulation de gènes impliqués dans différentes catégories fonctionnelles en réponse à différents stimuli.

3. L'homéostasie du fer dans les relations hôte-pathogènes

Le fer est un élément essentiel pour tous les organismes, incluant les mammifères. L'hôte a développé des mécanismes pour empêcher l'acquisition du fer de l'organisme par le pathogène lors d'une infection.

3.1. Homéostasie du fer chez l'hôte

Le contrôle de la quantité de fer systémique se fait au travers de la régulation de l'acquisition du fer et de son stockage, puisqu'à ce jour, aucune forme d'excrétion du fer n'est connue chez les mammifères. La perte du fer chez l'homme se produit lors de la desquamation des entérocytes, des menstruations et lors de la naissance. Cependant, ces processus sont indépendants du statut ferrique de l'hôte [294] (Figure 29).

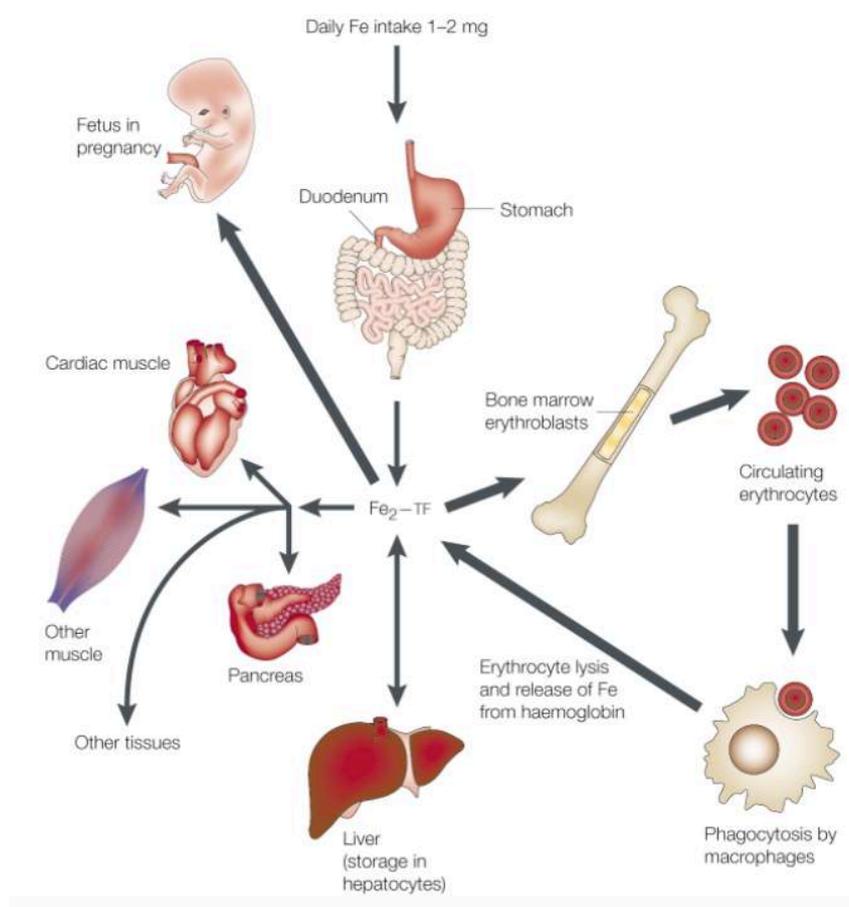


Figure 29 Répartition du fer présent dans l'organisme

Les adultes contiennent environ 3 à 5g de fer au total. Environ 0,5 à 2mg proviennent de l'absorption du fer alimentaire par les entérocytes. La même quantité de fer est perdue *via* la desquamation des cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal. La majorité du fer est présent dans les érythrocytes. Le recyclage des érythrocytes sénescents représente la plus grande source de fer. D'après [295]

Les érythrocytes sénescents phagocytés par les macrophages, qui récupèrent le fer des molécules de l'hème, et qui peuvent alors le stocker ou le libérer dans le plasma selon les besoins du corps, constituent la principale source de fer pour l'hôte (Figure 30, à gauche).

La seconde source de fer provient de l'intestin. L'absorption du fer est réalisée par les cellules intestinales du duodénum et dans le haut du jéjunum. Dans l'intestin, le fer existe sous deux formes principales : héminique (contenant de l'hème) et non héminique. Selon la forme sous laquelle il se trouve, le fer est absorbé différemment par l'entérocyte au niveau de son pôle apical (Figure 30, à droite).

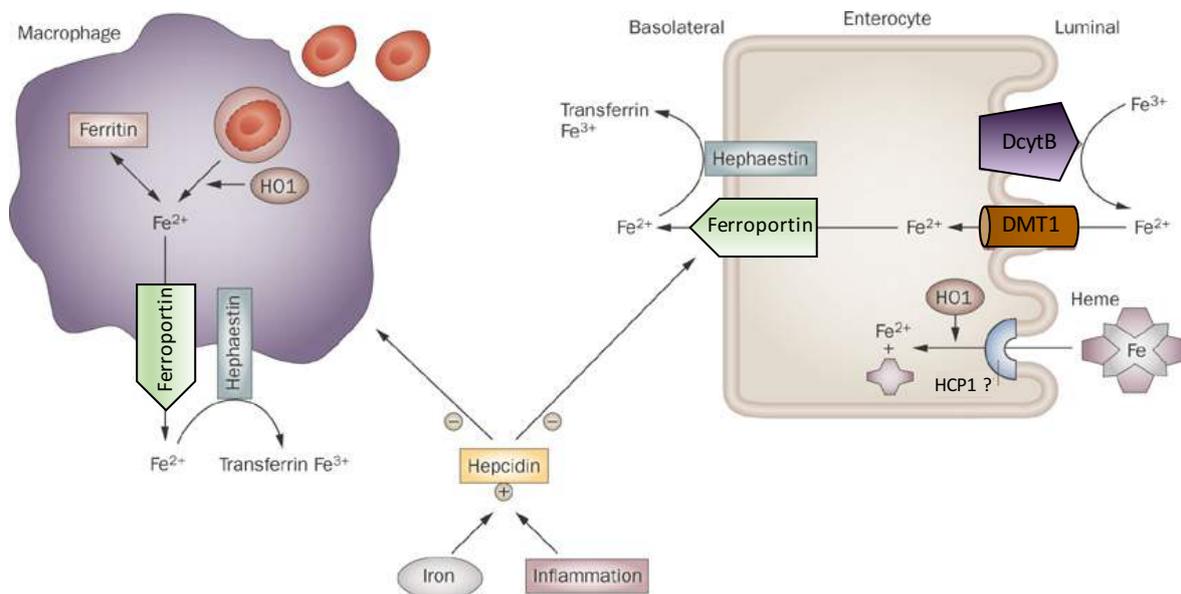


Figure 30 Homéostasie du fer chez l'hôte et régulation par l'hepcidine. .

L'hepcidine agit en diminuant l'absorption intestinale du fer alimentaire ainsi que le recyclage du fer par les macrophages. Adapté de [296]

Le fer ferrique (non héminique) est réduit en fer ferreux Fe^{2+} par une réductase (DcytB, *duodenal cytochrome B*) puis transporté dans les entérocytes par le transporteur DMT1 (*divalent metal transporter 1*), également appelé Nramp2 ou Slc11a2 [297]. Ce transporteur transmembranaire, connu pour être le seul, est exprimé à la surface apicale des entérocytes dans l'intestin grêle, mais également présent dans les endosomes de toutes les cellules. Les souris possédant une délétion de Dmt1 présentent une anémie sévère, puisqu'elles sont incapables d'absorber le fer alimentaire.

Le fer héminique (fer ferreux, Fe^{2+}) est transporté dans l'entérocyte probablement *via* le transporteur apical spécifique HCP1 (*heme carrier protein 1*). Puis le fer est libéré dans la cellule suite à l'action de l'hème-oxygénase 1 (HMOX1).

Le fer absorbé dans le cytosol par DMT1 est ensuite soit stocké dans la molécule de stockage ferritine (composée de 24 sous-unités avec un noyau central contenant plus de 4 500 atomes de fer Fe^{3+}), soit utilisé dans les processus cellulaires de la cellule, soit exportée dans le plasma par un exporteur basolatéral nommé ferroportine, unique exporteur du fer cellulaire présent dans tous les types cellulaires impliqués dans l'export du fer (incluant macrophages, cellules du placenta, ...) (Figure 30). Dans ce cas, le fer circule au sein de l'entérocyte. Le passage du fer au travers de la membrane basolatérale vers le plasma est assuré par un transporteur appelé ferroportine. Le fer nécessite alors d'être oxydé pour permettre son association sur la transferrine. Cette oxydation est effectuée par l'héphaestine. Les autres cellules acquièrent leur fer par un processus d'endocytose utilisant un récepteur pour la transferrine circulante chargée de fer. Une fois dans l'organisme, le fer est distribué sur différents sites : principalement la moelle osseuse où il est utilisé pour la fabrication des globules rouges et dans les sites de stockage comme le foie. Ainsi, la transferrine a deux rôles principaux, elle permet de limiter la génération de radicaux toxiques, et dirige le fer vers les cellules qui expriment les récepteurs de la transferrine.

Les mouvements de fer au sein de l'organisme sont soumis à une régulation à deux niveaux : une régulation de l'absorption intestinale, et une régulation au niveau du recyclage du fer. Un facteur humoral, l'hepcidine, bloque ces mouvements, que ce soit au niveau de l'absorption intestinale ou au niveau du recyclage du fer par les macrophages [298]. C'est une petite protéine majoritairement synthétisée par le foie et sécrétée dans la circulation sanguine. Elle provoque la dégradation de la ferroportine, chargée d'exporter le fer en dehors des cellules telles que les entérocytes ou les macrophages. Ainsi, en présence d'hepcidine, la ferroportine est dégradée, le fer alimentaire s'accumule dans les entérocytes et ne peut en sortir. De la même façon, le fer issu du recyclage des globules rouges reste bloqué dans les macrophages. A l'inverse, dans le cas d'un stock de fer insuffisant, la totalité du fer capté par les entérocytes passe rapidement dans la circulation sanguine, de même que le fer macrophagique.

3.2. La bataille pour le fer dans l'intestin

L'un des nutriments les plus importants pour la survie de la bactérie est le fer. Le taux de fer libre dans l'intestin est extrêmement faible, notamment dû au fait que celui-ci est séquestré par l'hôte et complexé à des protéines telles que l'hème, la ferritine, la transferrine et la

lactoferrine [299,300]. Du fait de l'importance du fer dans de nombreux processus métaboliques, sa séquestration par l'hôte vis-à-vis des organismes infectieux est l'une des défenses innées contre l'infection [187].

Le tractus GI peut être vu comme un ensemble hétérogène de niches microbiennes. Dans le tractus GI la source de fer majeure pour les bactéries résidentes est le fer alimentaire. La compétition pour le fer se fait à deux niveaux : compétition entre les bactéries de l'intestin et compétition hôte-bactéries.

3.2.1. Compétition hôte-bactéries

Une étude publiée récemment montre que la concentration du fer cæcal de souris axéniques est dix fois supérieure à celle de souris conventionnelles [301], alors que les paramètres systémiques du fer chez l'hôte étaient inchangés. La colonisation de souris axéniques par des représentants des deux phyla majeurs du microbiote, les Bacteroidetes et les Firmicutes, n'induit pas une diminution du fer cæcal, suggérant que d'autres résidents bactériens modulent la concentration du fer [301], et que l'hôte adapte son homéostasie du fer en fonction des bactéries présentes dans l'intestin. Par ailleurs, il existe un gradient de fer dans le tractus gastro-intestinal. En effet, si la concentration de fer dans le lumen est élevée, elle diminue au fur et à mesure que l'on se rapproche de la barrière épithéliale, au sein du mucus [84], conséquence notamment de la sécrétion de protéines liant le fer par l'hôte.

La sécrétion au niveau du mucus de protéines liant le fer induit une diminution de la disponibilité du fer aux bactéries présentes dans l'intestin. Ces mécanismes d'immunité innée sont d'autant plus induits lors d'une infection [55]. En premier lieu, des protéines de l'hôte comme la ferritine, la transferrine, la lactoferrine et les hémoprotéines se lient au fer, permettant de maintenir une concentration en fer très faible (10^{-24} M). Dans ces conditions, les bactéries ont développé des récepteurs spécifiques de la transferrine et de la lactoferrine.

Les bactéries synthétisent de petites molécules ayant une grande affinité pour le fer ferrique, les sidérophores, capables de chélater le fer libre ou de le prendre directement des protéines de l'hôte qui le séquestrent. L'entérobactine est produite par plus de 90% des isolats d'entérobactéries, incluant *Salmonella* et *E. coli* [302]. En condition d'inflammation, les cellules épithéliales, les neutrophiles et les macrophages de l'hôte sécrètent un peptide antimicrobien, la lipocaline-2, également appelé NGAL pour (*neutrophil gelatinase-associated*

lipocalin). Cette protéine est capable de lier certains sidérophores bactériens de type catécholate, comme l'entérobactine. Cette liaison de la lipocaline-2 avec les sidérophores cause leur séquestration, ce qui limite la croissance des bactéries qui les utilisent. Ainsi, la séquestration du complexe entérobactine-fer, permet de limiter la croissance des souches comme *E. coli* [303,304]. Par ailleurs, une étude montre que des souris *Lcn2^{-/-}*, ne synthétisant plus cette protéine, sont plus sensibles à l'infection de bactéries pathogènes, montrant que la lipocaline-2 est un système efficace du système immunitaire [303,305].

Afin d'échapper à cette séquestration, certaines bactéries synthétisent les salmochélines, dérivés glycosylés de l'entérobactine, non reconnus par la lipocaline-2 [174]. Si presque toutes les souches de *E. coli* produisent l'entérobactine, les salmochélines, et deux autres sidérophores, la yersiniabactine et l'aérobactine sont retrouvées plus souvent parmi les souches pathogènes [306], notamment celles appartenant au groupe phylogénétique B2.

Ainsi, arborer un répertoire varié de sidérophores permet une meilleure adaptation des bactéries aux changements de conditions et contribue à la sélection de niches bactériennes dans l'intestin.

3.2.2. Compétition bactéries-bactéries

En plus de la compétition avec l'hôte, *E. coli* entre également en compétition pour le fer avec les autres espèces bactériennes présentes dans l'intestin. En effet, l'efficacité des mécanismes d'acquisition du fer favorise la croissance de *E. coli* et limite celles des autres avec qui elle est en contact.

Ainsi, une étude montre que la souche probiotique Nissle 1917, qui produit un arsenal de mécanismes d'acquisition du fer (l'entérobactine, les salmochélines, l'aérobactine, la yersiniabactine, et le transporteur de l'hémine ChuA), limite la croissance de *S. Typhimurium* en limitant la quantité de fer disponible (Deriu *et al.*, 2013). Une autre étude menée *in vitro* montre que deux Bifidobactéries, *Bifidobacterium pseudolongum* PV8-2 (Bp PV8-2) et *Bifidobacterium kashiwanohense* PV20-2 (Bk PV20-2), inhibent la croissance et l'adhésion de souches pathogènes comme *Salmonella Typhimurium* et *Escherichia coli* O157:H45 (EHEC) sur des cellules épithéliales intestinales [307] d'une manière fer-dépendante.

Par ailleurs, Li *et al.* montre que l'expression des voies d'acquisition du fer ferrique, régulées par Fur et RyhB, des souches de *E. coli* résidants dans la couche de mucus était plus importante que dans des souches de *E. coli* résidant dans la lumière intestinale, [84]. Ceci peut en partie s'expliquer par le fait que la quantité de fer luminal soit plus importante que celle présente dans la couche de mucus [84], et que l'acquisition du fer soit nécessaire à la colonisation dans la couche de mucus.

Certaines bactéries produisent en plus des microcines et des sidéromycines. Les microcines sont des peptides antibactériens qui utilisent les récepteurs des sidérophores pour rentrer dans la bactérie cible [308]. Il a récemment été montré que la production de microcines était souvent associée au groupe phylogénétique B2 de *E. coli* [309]. Une étude récente montre que dans un modèle murin d'inflammation intestinale, la souche probiotique de *E. coli* Nissle 1917 limite la croissance des *Enterobacteriaceae*, y compris *E. coli* grâce à la production de microcines [310]. Cette étude montre ainsi qu'il existe une compétition intra- et inter- espèce dans l'intestin.

Les sidéromycines sont une classe d'agents antimicrobiens qui sont délivrés au travers des récepteurs des sidérophores, de même que les microcines [311,312]. Les sidéromycines sont des antibiotiques conjugués aux sidérophores et qui montrent des activités antimicrobiennes contre les bactéries sidérophiles [313], comme les *Enterobacteriaceae* et *S. aureus*. Ces interactions entre bactéries sidérophiles et les producteurs de microcines ou sidéromycines, constituent un mécanisme supplémentaire dans lequel le fer peut potentiellement moduler le microbiote intestinal.

En conclusion, pour survivre dans le tractus gastro intestinal, les bactéries doivent éviter les défenses de l'hôte, acquérir les nutriments essentiels qui sont séquestrés par l'hôte, et rivaliser avec les autres membres de la microflore intestinale, faisant partie ou non de la même espèce.

Résultats

Expérimentaux

OBJECTIFS

Escherichia coli est un hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'Homme et des animaux à sang chaud, et s'établit dans le tractus digestif dès les premières heures ou jours qui suivent la naissance. L'espèce *E. coli*, bactérie anaérobie facultative prévalente, peut être divisée en sept groupes phylogénétiques principaux. Le groupe phylogénétique B2 de *E. coli* est souvent associé à des infections aiguës ou chroniques telles que des septicémies, des méningites néonatales ou la maladie de Crohn. Des études épidémiologiques récentes montrent que le portage des souches du groupe phylogénétique B2 est en augmentation dans les pays industrialisés, au détriment du groupe ancestral A [108,111,314]. Les raisons qui expliquent cette évolution restent encore inconnues, même s'il semblerait que ce soit un ensemble de facteurs environnementaux (comme l'alimentation, l'hygiène, ...) qui aboutiraient à ce changement.

Le groupe phylogénétique B2 produit le plus grand nombre de sidérophores et ont donc une capacité accrue à acquérir le fer. Par ailleurs, 50% de ces souches produisent la génotoxine colibactine. Notre laboratoire a récemment montré l'existence d'une connexion entre ces deux types de métabolites secondaires fonctionnellement distincts via la PPTase ClbA. En effet, celle-ci peut participer à la synthèse des sidérophores.

Sachant que la biosynthèse des sidérophores est régulée par le métabolisme du fer, nous nous sommes interrogés, dans un premier temps, sur la régulation potentielle de la transcription de *clbA* et la synthèse de la colibactine par le fer.

Sachant que l'Homme héberge dans son microbiote des souches de *E. coli* du groupe B2 qui synthétisent à la fois la colibactine et les sidérophores, nous nous sommes interrogés dans un second temps sur le rôle de la colibactine, et de la connexion entre sidérophores et colibactine, dans la colonisation du tractus GI.

Le but étant, *in fine*, de tenter d'expliquer en partie les raisons de l'augmentation de la prévalence des souches du groupe phylogénétique B2 dans les pays développés, mon travail de recherche s'est articulé autour de deux axes.

1. Étude de la régulation de la transcription de *clbA* et de la biosynthèse de la colibactine en fonction de la quantité de fer
2. Étude du rôle de la colibactine dans la colonisation intestinale du tube digestif, niche primaire de *E. coli*.

CHAPITRE I : L'HOMÉOSTASIE DU FER RÉGULE LA GÉNOTOXICITÉ DES *ESCHERICHIA COLI* QUI PRODUISENT LA COLIBACTINE.

Depuis ces 30 dernières années, il a été observé une augmentation du groupe phylogénétique B2 dans les populations des pays développés [108,198]. Ces souches sont souvent associées à des infections aiguës ou chroniques. Les souches du groupe phylogénétique B2 ont une capacité supérieure à acquérir le fer, notamment grâce à la production de sidérophores. Par ailleurs, environ 50% des souches de ce groupe phylogénétique sont capable de synthétiser la génotoxine colibactine.

Notre laboratoire a montré qu'il existe une connexion entre les voies de biosynthèse de la colibactine et des sidérophores via *ClbA* [126]. Parce que la biosynthèse des sidérophores est régulée par le métabolisme du fer, notamment via la PPTase impliquée dans leur biosynthèse : EntD, nous avons fait l'hypothèse que la transcription de *clbA* et la biosynthèse de la colibactine pourraient également être régulées par le fer.

Nous avons ainsi étudié dans un premier temps la régulation de la transcription du gène *clbA* en fonction de la disponibilité en fer. Nos résultats ont mis en évidence que la transcription du gène *clbA* était régulée par la disponibilité en fer. En effet, en condition de carence en fer, la transcription de *clbA* est induite. En revanche, la transcription de ce gène est réprimée en présence de fer. En appliquant une approche de microbiologie moléculaire, nous avons montré que Fur, le régulateur global de l'homéostasie du fer chez la bactérie, régulait positivement la transcription de *clbA* ainsi que la biosynthèse de la colibactine, et ce par un mécanisme direct. En effet, des expériences de retard sur gel ont révélé que Fur se fixe en amont du gène *clbA*. Nous avons identifié *in silico* deux sites de fixation spécifiques de Fur dans cette région. Par ailleurs, nous montrons dans cette étude que le petit ARN non codant RyhB, aussi impliqué dans la régulation de l'homéostasie du fer, régule négativement, à la fois la transcription du gène *clbA* et la biosynthèse de la colibactine. La prédiction de la fixation de RyhB sur l'ARNm de *clbA* suggère que cette régulation pourrait être directe.

En conclusion, nous avons démontré que le petit ARN RyhB et la protéine Fur, deux acteurs clés de la régulation du métabolisme du fer, modulaient la transcription de *clbA*, aboutissant à une modulation de la biosynthèse de la colibactine, produite par environ 50% des *E. coli* appartenant au groupe phylogénétique B2. Cette régulation fer-dépendante de la biosynthèse de la colibactine ainsi que la connexion entre celle-ci et les sidérophores, pourraient expliquer en partie l'émergence des souches de ce groupe phylogénétique dans le microbiote intestinal, niche principale de *E. coli*.

Ces résultats sont rapportés dans l'article « Iron homeostasis regulates the genotoxicity of *Escherichia coli* that produces colibactin », sous presse dans le journal « Infection and Immunity ».



AQ:A **Iron Homeostasis Regulates the Genotoxicity of *Escherichia coli* That Produces Colibactin**

AQ:au **Sophie Tronnet,^{a,b} Christophe Garcia,^{a,b,c} Nadine Rehm,^{d,e} Ulrich Dobrindt,^{d,e} Eric Oswald,^{a,b,c} Patricia Martin^{a,b,c}**

AQ:aff IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRA, ENVT, UPS, Toulouse, France^a; Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France^b; CHU Toulouse, Service de Bactériologie-Hygiène, Toulouse, France^c; Institute of Hygiene, University of Münster, Münster, Germany^d; Interdisciplinary Center for Clinical Research (IZKF), University of Münster, Münster, Germany^e

The genotoxin colibactin is a secondary metabolite produced by a variety of pathogenic enterobacteria. Its biosynthesis requires the enzymatic activity of the phosphopantetheinyl transferase (PPTase) ClbA. We previously showed that ClbA can also contribute to the production of siderophores. Because the biosynthesis of siderophores is regulated by iron availability, we hypothesized that iron could also modulate the production of colibactin through the transcriptional regulation of *clbA*. This study revealed an increased transcription of *clbA* under iron-limiting conditions and a decrease of *clbA* expression in iron-rich media. We demonstrate that *clbA* transcription is regulated by both the ferric uptake regulator (Fur) and the small regulatory noncoding RNA RyhB. We evidenced that the regulation of the transcription of *clbA* by Fur and RyhB leads to the regulation of colibactin production. This work highlights the complex mechanism of regulation of an important virulence factor by the two major regulators of bacterial iron homeostasis, making iron a key environmental factor contributing to bacterial virulence and carcinogenesis.

AQ:B In the human body, most of the iron is intracellular or sequestered by proteins, which makes it unavailable to invading microbes. This process, i.e., nutritional immunity, is a critical host defense strategy against bacterial pathogens that perceive the scarcity of iron within the vertebrate host as a means to sense that they are in their host (1). The global response to iron deprivation in bacteria relies on the ferric uptake regulator (Fur) protein and the small regulatory noncoding RNA (sRNA) RyhB (2–4). In the classical Fur regulation paradigm, Fur binds ferrous ions and the dimeric Fe²⁺-Fur complex (holo-Fur) recognizes target sequences upstream of iron-regulated genes and represses their transcription. However, nowadays numerous reports support four modes of Fur regulation, i.e., apo- and holo-Fur activation and repression, establishing a significant deviation from the classical model of Fur regulation (5). In bacteria, archaea, and eukaryotes, small riboregulators have been shown to mediate posttranscriptional mechanisms of gene regulation (6). In many cases, sRNAs form base pairs with and sequester mRNA ribosome-binding sites, resulting in translational repression and accelerated transcript decay. In contrast, a growing number of examples of translational activation and mRNA stabilization by sRNAs have now been documented. A given sRNA often employs a conserved region to interact with and regulate both repressed and activated targets (6, 7).

To counteract iron deprivation, bacterial pathogens synthesize small iron-scavenging molecules, i.e., siderophores, that are crucial for their survival and play a significant role in virulence (8–10). Siderophores are nonribosomal peptides (NRP) or polyketide (PK)-NRP hybrids (11). A prerequisite for the synthesis of all NRPs, PKs, and PK-NRP hybrids is the posttranslational attachment of P-Pant arms from coenzyme A (CoA) to a conserved serine residue of a carrier protein, converting inactive apo-synthases to active holo-synthases. This reaction is catalyzed by members of the type II family of phosphopantetheinyl transferases (PPTases) (12). The core genome of *Escherichia coli* codes for two type II PPTases, i.e., EntD and YieE (*ECK3705*, *b3712*, *JW3690*, *JW3690*) (13). Whereas the role of YieE remains elusive, EntD is

the PPTase involved in the biosynthesis of the siderophores enterobactin, salmochelin, and yersiniabactin.

An additional type II PPTase, i.e., ClbA, is encoded on the *pks* gene cluster, responsible for the synthesis of the PK-NRP hybrid colibactin in diverse pathogenic enterobacteria, including approximately 50% of the *E. coli* strains that belong to phylogenetic group B2 (14). Colibactin is a genotoxin that induces DNA double-strand breaks, senescence, and chromosomal abnormalities in eukaryotic cells (15–17) and was demonstrated to be a bona fide virulence factor in a mouse model of sepsis (18) and in a rat model of neonatal meningitis (19). We have recently highlighted the existence of cross talk between colibactin and siderophore biosynthesis (20). Indeed, ClbA can replace EntD and contribute to siderophore biosynthesis. Therefore, we speculated that this interplay could constitute a fitness advantage for *E. coli* and that iron could play a key role in this connection.

Here we show that the expression of *clbA* is controlled by iron bioavailability and that the production of colibactin is regulated by Fur and RyhB. Therefore, iron could constitute a key environmental factor contributing to the virulence and carcinogenicity of *E. coli* strains producing colibactin.

Received 30 July 2016. Returned for modification 24 August 2016.
Accepted 3 September 2016.

Accepted manuscript posted online 12 September 2016.

Citation Tronnet S, Garcia C, Rehm N, Dobrindt U, Oswald E, Martin P. 2016. Iron homeostasis regulates the genotoxicity of *Escherichia coli* that produces colibactin. *Infect Immun* 84:000–000. doi:10.1128/IAI.00559-16.

Editor: A. J. Baumler, University of California, Davis

Address correspondence to Eric Oswald, ericoswald@inserm.fr, or Patricia Martin, patricia.martin@inserm.fr.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00559-16>.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

zii01216/zii1880d16z | xppws | S=1 | 10/15/16 | 2:13 | 4/C Fig: 5,7 | ArtID:00659-16 | NLM: research-article | free-access | CE: MKH

Tronnet et al.

TABLE 1 Strains, plasmids, and primers used in this study

Strain, plasmid, or primer	Description or sequence ^a	Reference or source
<i>E. coli</i> strains		
Nissle 1917 <i>clbA-lux</i>	Luciferase fusion of the gene <i>clbA</i> , Kan ^r	22
Nissle 1917 <i>clbR-lux</i>	Luciferase fusion of the gene <i>clbR</i> , Kan ^r	22
Nissle 1917 <i>clbB-lux</i>	Luciferase fusion of the gene <i>clbB</i> , Kan ^r	22
Nissle 1917 <i>clbQ-lux</i>	Luciferase fusion of the gene <i>clbQ</i> , Kan ^r	22
Nissle 1917 <i>clbA-lux ΔryhB</i>	<i>ryhB</i> mutant strain, Kan ^r Cm ^r	This study
Nissle 1917 <i>clbA-lux ΔryhB+p-ryhB</i>	<i>ryhB</i> mutant strain carrying <i>p-ryhB</i> , Kan ^r Cm ^r Amp ^r	This study
Nissle 1917 <i>clbA-lux Δfur</i>	<i>fur</i> mutant strain, Kan ^r Cm ^r	This study
Nissle 1917 <i>clbA-lux Δfur+p-fur</i>	<i>fur</i> mutant strain carrying <i>p-fur</i> , Kan ^r Cm ^r Amp ^r	This study
M1/5	Colibactin producer, commensal strain	20
M1/5 <i>ΔryhB</i>	<i>ryhB</i> mutant strain, Cm ^r	This study
M1/5 <i>ΔryhB+p-ryhB</i>	<i>ryhB</i> mutant strain carrying <i>p-ryhB</i> , Cm ^r Amp ^r	This study
M1/5 <i>Δfur</i>	<i>fur</i> mutant strain, Kan ^r	This study
M1/5 <i>Δfur+p-fur</i>	<i>fur</i> mutant strain carrying <i>p-fur</i> , Kan ^r Amp ^r	This study
Nissle 1917	Colibactin producer, probiotic strain	16
Nissle 1917 <i>ΔclbA+pBAD33-clbA</i>		This study
Nissle 1917 <i>ΔclbA+pBAD33-clbA</i>	<i>clbA</i> mutant strain carrying <i>pBAD33-clbA</i> , Kan ^r	This study
Nissle 1917 <i>ΔclbA+pBAD33-clbAΔclbR</i>	<i>clbA</i> mutant strain carrying <i>pBAD33-clbAΔclbR</i> , Kan ^r	This study
Nissle 1917 <i>ΔryhB</i>	<i>ryhB</i> mutant strain, Cm ^r	This study
Nissle 1917 <i>ΔryhB+p-ryhB</i>	<i>ryhB</i> mutant strain carrying <i>p-ryhB</i> , Cm ^r Amp ^r	This study
Nissle 1917 <i>Δfur</i>	<i>fur</i> mutant strain, Kan ^r	This study
Nissle 1917 <i>Δfur+p-fur</i>	<i>fur</i> mutant strain carrying <i>p-fur</i> , Kan ^r Amp ^r	This study
SP15	Colibactin producer, pathogenic strain	35
SP15 <i>ΔryhB</i>	<i>ryhB</i> mutant strain, Cm ^r	This study
SP15 <i>ΔryhB+p-ryhB</i>	<i>ryhB</i> mutant strain carrying <i>p-ryhB</i> , Cm ^r Amp ^r	This study
SP15 <i>Δfur</i>	<i>fur</i> mutant strain, Kan ^r	This study
SP15 <i>Δfur+p-fur</i>	<i>fur</i> mutant strain carrying <i>p-fur</i> , Kan ^r Amp ^r	This study
MG1655 <i>ΔryhB</i>	<i>ryhB</i> mutant strain, Cm ^r	Gift from C. M. Dozois
Bw25113 <i>Δfur</i>	<i>fur</i> mutant strain, Kan ^r	Gift from C. M. Dozois
Plasmids		
<i>p-ryhB</i>	High-copy-no. pSC-A plasmid carrying the <i>ryhB</i> gene; Amp ^r Kan ^r	This study
<i>p-fur</i>	High-copy-no. pSC-A plasmid carrying the <i>fur</i> gene; Amp ^r Kan ^r	This study
<i>pBAD33-T7-Venus</i>	High-copy-no. pBAD33 plasmid containing the <i>Venus</i> gene coding for a variant of the yellow fluorescent protein of <i>Aequorea victoria</i>	This study
<i>pBAD33-T7-clbA</i>	High-copy-no. pBAD33-T7 plasmid carrying the <i>Venus</i> fusion of the <i>clbA</i> gene	This study
<i>pBAD33-T7-clbAΔclbR</i>	High-copy-no. pBAD33-T7 plasmid carrying the <i>Venus</i> fusion of the <i>clbA</i> gene and mutated <i>clbR</i>	This study
Primers		
Fur-P1	AAAATCCTGGAAGTTCCTTCAGGAGCCGGACAACCATCACGTCAGTGGGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	This study
Fur-P2	TTGGCGGCAATCGCCITCGGCACAGTGACCGTAAAGATAGAGACTGTGGTCATATGATATATCCTCCTTAG	This study
Fur_F	CGCCCTAAAGAAAGCTGGCC	This study
Fur_R	CCITCGTGCGCATGTTCATC	This study
Fur_F_Comp1	CTGTAAGCTGTGCCACGTTTT	This study
Fur_R_comp1	CTGAGAGCTGTAACCTCGCITTTTC	This study
CMD1171_ST (<i>ryhB::cat</i>)	TTTGGGGTAAATGTCCCTTTC	29
CMD1172_ST (<i>ryhB::cat</i>)	GTCCGCATAACGAACACAAG	29
RyhB_F_Comp1	CCTCTCGAGAAAGCGGACGTGGTTCTCTAC	This study
RyhB_R_Comp1	GTACTCGAGTGTTCCTGCGTGGCGTATTAC	29
Venus-XbaI	GCGCTCTAGATGGTGTCATCACTAAAGATCAAATC	This study
Venus-fus-as	GCGCGTGGACTTACTTGTACAGCTCGTCCATG	This study
T7-term-fw	AAGGGGATCCGGCTGCTAAC	This study
T7-term-rev	GCGCAATTGCGGATATAGTTCCTCCTTTCAG	This study
<i>pBAD33-Venus-Bam-rev</i>	GCGCGGGATCCGGCTGCTAACAAAG	This study
<i>pBAD33-Venus-fw</i>	P-TGGTGTCTATCACTAAAGATCAAATC	This study
<i>clbA</i> -p-BamHI-fw	GCGCGGATCCAAACCATCACTTATTAATCGG	This study
<i>clbA</i> -p-rev1-l	TTAGATAATCTCATTCCTGTTAGC	This study

(Continued on following page)

TABLE 1 (Continued)

Strain, plasmid, or primer	Description or sequence ^a	Reference or source
<i>clbAp-DelclbR-fw2</i>	CCGTTATCTAAGACAAGTATGCGCATG	This study
<i>clbAp-DelclbR-rev2</i>	ACTTGTCTAGATAACGGGTTTTTTCTTTG	This study
<i>fyuA-up</i>	CAACGGCCAGGCGCTTTAC	This study
<i>fyuA-rev</i>	GCGTGTCTTCGTCTTGCTG	This study
<i>clbC-up</i>	CGAGTCAAATGCGCCATCAC	This study
<i>clbC-rev</i>	GGACCCGCATACCAATAATG	This study
JPN41	CAGATACACAGATACCATTC	14
JPN42	TCAATGAGGAAGAAATAAAC	14

^aRestriction sites are underlined. A P in front of the sequence indicates a phosphate residue.

MATERIALS AND METHODS

T1

Bacterial strains, mutagenesis, and growth conditions. The bacterial strains used in this study are listed in Table 1. For genetic manipulations, *E. coli* strains were routinely grown at 37°C with shaking at 240 rpm in 3 ml of Lennox L broth (LB; Invitrogen). Ampicillin (50 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml), or chloramphenicol (25 µg/ml) was added to the medium when required. Gene inactivations were performed using the bacteriophage lambda Red recombinase method (21) and the primers listed in Table 1. Briefly, the *ryhB::cat* and *fur::kan* alleles were PCR amplified from the chromosomal DNA of strain MG1655 Δ *ryhB* or Bw25113 Δ *fur*, respectively, using primers CMD1171_ST/CMD1172_ST or Fur_F/Fur_R, respectively. The purified PCR product was used to transform the strains of interest. The allelic exchanges were confirmed by PCR using the same pairs of primers. The resulting mutants where *ryhB* or *fur* was disrupted by a resistance cassette were named the Δ *ryhB* and Δ *fur* mutants, respectively. To generate the *fur::cat* mutation in strain Nissle 1917 *clbA-lux*, the chloramphenicol cassette was PCR amplified using primers Fur_P1/Fur_P2. The purified PCR product was used to transform *E. coli* Nissle 1917 *clbA-lux*. The transformants were tested by PCR amplification using primers Fur_F/Fur_R. For cloning of the wild-type *ryhB* and *fur* genes in cloning vectors, the *ryhB* and *fur* genes were PCR amplified using primer pairs RyhB_F_Compl/RyhB_R_Compl and Fur_F_Compl/Fur_R_Compl, respectively. The resulting PCR products were then cloned into the pSC-A vector using a StrataClone PCR cloning kit (Agilent Technologies). The presence of the appropriate insert in the resulting plasmids was checked by PCR amplification, and the plasmids were transformed into the mutant strains.

AQ: D

AQ: E

For the megalocytosis assay and assays for bioluminescence and fluorescence measurements, the *E. coli* strains were grown overnight in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing HEPES (DMEM-HEPES; Gibco), supplemented with antibiotics when required, at 37°C with shaking (240 rpm). The overnight cultures were then diluted 1:50 in DMEM-HEPES supplemented or not with iron (FeCl₃, 100 µM; FeSO₄, 100 µM), magnesium (MgSO₄, 100 µM), copper (CuCl₂, 100 µM), or iron chelator (8-hydroxyquinoline [8-HQ; 40 µM] or desferrioxamine [DFO; 0.2 µM]) and grown until the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) was 0.6. The ranges of concentrations of the chelator and the iron supplement were analyzed, and the highest concentrations of substances which did not alter bacterial growth were chosen.

Construction of Venus fusions. A low-copy-number vector system was used to generate *clbA* promoter fusions with the *Venus* gene as a reporter. For this purpose, a derivative of vector pBAD33, which was devoid of the elements required for L-arabinose-dependent expression, was employed. An overview about the construction of the plasmids is given in Fig. S3 in the supplemental material.

In more detail, the translational fusion of the first 24 bp of *rplL* and the *Venus* gene, coding for a variant of the yellow fluorescent protein of *Aequorea victoria*, was amplified from pMBrplL-Venus using the primers Venus-XbaI and Venus-fus-as. The PCR product was digested with XbaI and SalI and cloned into pBAD33 (see step 1 in Fig. S3 in the supplemental

material). The resulting plasmid was digested with EcoRV and SacI, treated with mung bean nuclease (MBN), and religated as plasmid pBAD33-Venus in order to delete the *araBAD* promoter and the *araC* gene (see step 2 in Fig. S3). Since the aim was to clone the whole *clbBR* intergenic region together with the *clbR* gene, which harbors the *clbA* promoter, the transcription into the opposite direction of *clbA*, facing *clbB*, had to be blocked. To achieve this, the T7 terminator sequence of pTXB1 (NEB) was amplified with primers T7-term-for and T7-term-rev, subsequently digested with BamHI and MfeI, and cloned upstream of *Venus* into pBAD33-Venus, resulting in pBAD33-T7-Venus (see step 3 in Fig. S3). The plasmid was verified by sequencing.

The whole pBAD33-T7-Venus sequence was amplified via PCR as a precursor for the following plasmids by using primers pBAD33-Venus-Bam-rev and pBAD33-Venus-fw and subsequently digested with BamHI (see step 4 in Fig. S3). To yield pBAD33-T7-*clbA*, the 648-bp DNA sequence upstream of *clbA* in *E. coli* strain M1/5 (20), comprising the putative *clbA* promoter, the *clbR* gene, as well as the whole *clbBR* intergenic region (*clbBR* in. reg.), was amplified with primers *clbAp*-BamHI-fw and *clbAp*-rev1-1, digested with BamHI, and then ligated with the digested pBAD33-T7-Venus amplicon (see step 5a in Fig. S3). To generate pBAD33-T7-*clbA* Δ *clbR*, a derivative of pBAD33-T7-*clbA* with a deletion of *clbR* nucleotides 33 to 40, a two-step-PCR was carried out using *E. coli* M1/5 as a template (see step 5b in Fig. S3). Amplicons were generated with the primer pairs *clbAp*-BamHI-fw/*clbAp*-DelclbR-rev2 (PCR 1) and *clbAp*-DelclbR-fw2/*clbAp*-rev1-1 (PCR 2). PCR products 1 and 2 were fused using primers *clbAp*-BamHI-fw and *clbAp*-rev1-1 (PCR 3) and then digested with BamHI and ligated with PCR-amplified and BamHI-digested pBAD33-T7-Venus, resulting in pBAD33-T7-*clbA* Δ *clbR*. The plasmids were verified by sequencing.

AQ: F

AQ: G

Luciferase and Venus measurements. The promoter activities of genes *clbA*, *clbB*, *clbQ*, and *clbR* in different media were determined by time course quantification of luciferase or Venus expression. When an OD₆₀₀ of 0.6 was reached, bacterial subcultures were diluted to an OD₆₀₀ of 0.1 in the appropriate medium. Samples of 100 µl were then used to inoculate a black 96-well plate (Greiner Bio-One), and the bacteria were grown without shaking at 37°C in a luminometer (Tecan Infinite Pro microplate reader). For luminescence measurements, light emission (relative light units [RLU]) was recorded (6,000-ms aperture per sample) every 30 min in parallel with the OD₆₀₀. For Venus fluorescence measurements, fluorescence was recorded at 535 nm (bandwidth, 25 nm) using an excitation wavelength of 485 nm (bandwidth, 20 nm) with the luminometer. The OD₆₀₀ was measured in parallel at each time point. The area under the curve (AUC), which quantifies the cumulative luminescence or fluorescence, was calculated with Graph-Pad Prism (version 6.0) software.

AQ: H

Quantification of colibactin-associated genotoxic effect by megalocytosis assay. Quantification of the colibactin-associated genotoxic effect by megalocytosis assay was performed as previously described (14). Briefly, HeLa cells were grown in DMEM (GlutaMAX; Invitrogen) supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum (FCS; Eurobio) and 1%

Tonnet et al.

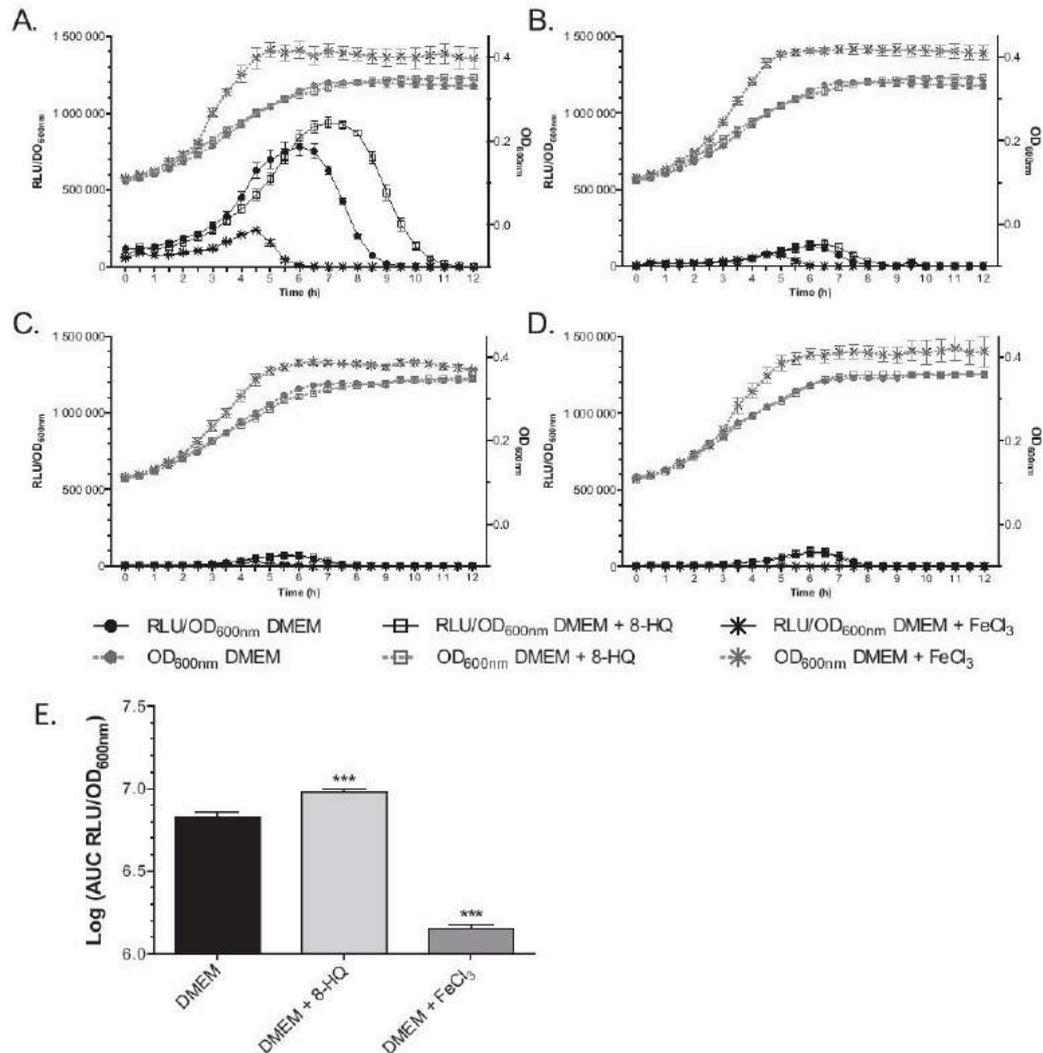


FIG 1 Iron availability modulates the transcription of *clbA*. Growth curves (OD₆₀₀) and the RLU/OD₆₀₀ of Nissle 1917 *clbA-lux* (A), *clbB-lux* (B), *clbQ-lux* (C), and *clbR-lux* (D) fusion strains grown at 37°C in DMEM-HEPES, DMEM-HEPES supplemented with 40 μM 8-HQ, or DMEM-HEPES supplemented with 100 μM FeCl₃. (E) AUC, determined with GraphPad Prism (version 6.0) software, of the RLU/OD₆₀₀ of *clbA* under the three different conditions. The given values are the mean number of RLU and SEMs from five independent experiments. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA and the Bonferroni posttest. ***, *P* < 0.001 compared to the mean values obtained in DMEM-HEPES.

AQ:L

(vol/vol) nonessential amino acids (Invitrogen) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. HeLa cells were dispensed in a 96-well cell culture plate (5 × 10⁵ cells/well) for 24 h and then infected at a multiplicity of infection (MOI; number of bacteria per HeLa cell at the onset of infection) of 100 with the *E. coli* strains, which had previously been pregrown in the appropriate medium. At 4 h postinoculation, the cells were washed 3 times with Hanks' balanced salt solution (HBSS; Gibco) and incubated in cell culture

medium for 72 h with 200 mg/ml gentamicin before fixation (4% formaldehyde) and protein staining with methylene blue (1% [wt/vol] in 0.01 M Tris-HCl). The methylene blue was extracted with 0.1 N HCl. Staining was quantified by measurement of the OD₆₀₀.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA). PCR products were generated by using genomic DNA from *E. coli* strain M1/5 as the template and the primers JPN42/JPN41 (*clbA*, 343 bp), clbC-up/clbC-rev (*clbC*, 219

AQ:1

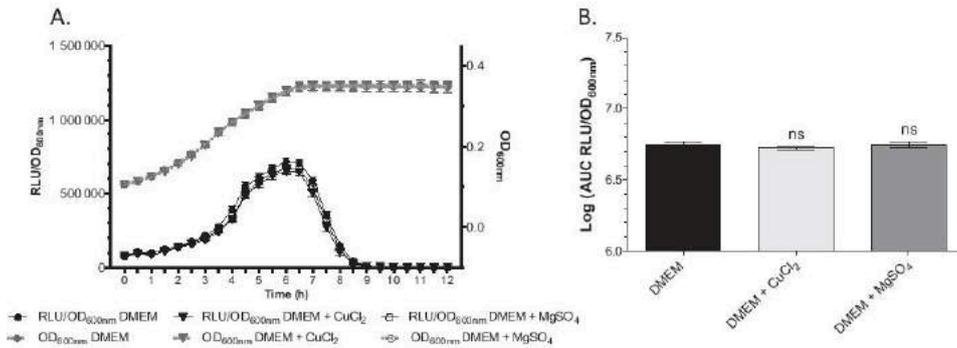


FIG 2 The transcription of *clbA* is not modulated by Cu²⁺ or Mg²⁺. Growth curves (OD₆₀₀) and the RLU/OD₆₀₀ of *E. coli* Nissle 1917 *clbA-lux* grown at 37°C in DMEM-HEPES and DMEM-HEPES supplemented with either 100 μM MgSO₄ or 100 μM CuCl₂ (A) and the associated AUC (B). The given values are the mean number of RLU and SEMs from at least three independent experiments. Statistical analysis was performed by comparison of the values to the mean values obtained in DMEM-HEPES using two-way ANOVA and the Bonferroni posttest. ns, not significant.

AQ: M

bp), and *fyuA-up/fyuA-rev* (*fyuA*, 648 bp) (Table 1). The PCR products were gel purified using a Wizard SV gel and PCR cleanup system (Promega). A 20-μl binding reaction mixture containing recombinant Fur protein (MyBioSource, USA), 50 μg ml⁻¹ of poly(dI-dC), 4 μl of 5× binding

buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.625 mM MnCl₂, 25% [vol/vol] glycerol, 2.5 mM dithiothreitol, 500 μg ml⁻¹ bovine serum albumin), and the DNA probe (10 nM) was incubated at room temperature for 30 min, loaded onto a 4% Tris-borate polyacrylamide gel,

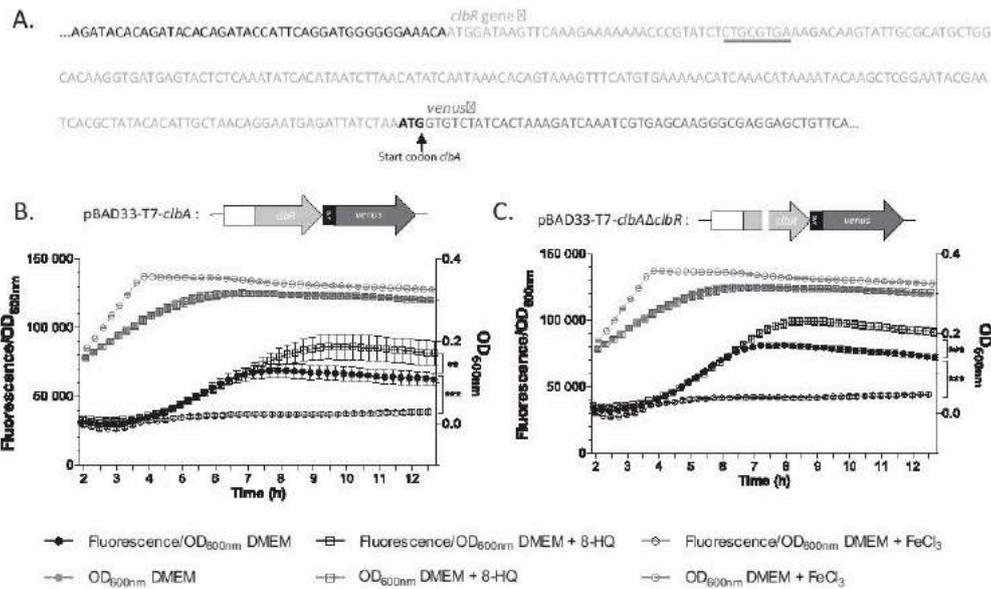


FIG 3 The transcription of *clbA* is dependent on the iron concentration in a *ClbR*-independent manner. (A) Sequence of the construction of the translational *Venus* fusion of *clbA* (*clbA-Venus* fusion). Two different constructs, one containing the wild-type *clbR* gene and one containing an inactive *clbR* gene, were generated. The underlined sequence was mutated to inactivate *clbR*. The wild-type and the mutated constructs were cloned into plasmid pBAD33-T7, and the plasmid was transformed into strain Nissle 1917 in which *clbA* was mutated. (B and C) Schematic representation of the plasmid construct obtained and results of the quantification of fluorescence of strain Nissle 1917 in which *clbA* was mutated and transformed with the plasmid containing the wild-type construct (B) or the mutated one (C). The fluorescence was measured in DMEM-HEPES or DMEM-HEPES supplemented with 100 μM FeCl₃ or 40 μM 8-HQ. The given values are the mean fluorescence/OD₆₀₀ and SEMs from three independent experiments. Statistical analysis was performed by comparison of the values to the mean values obtained in DMEM-HEPES using two-way ANOVA and the Bonferroni posttest. ***, *P* < 0.001; **, *P* < 0.01.

AQ: N

Tronnet et al.

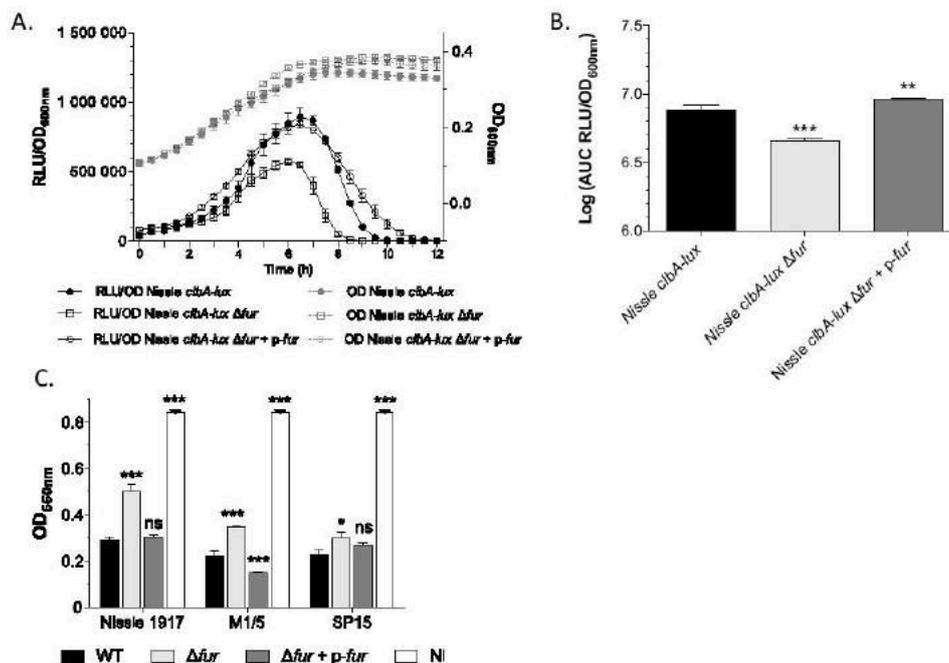


FIG 4 Fur regulates the transcription of *clbA* and colibactin biosynthesis. (A) Growth curves (OD₆₀₀) and the RLU/OD₆₀₀ of strains Nissle 1917 *clbA-lux*, Nissle 1917 *clbA-lux Δfur*, and Nissle 1917 *clbA-lux Δfur + p-fur* grown at 37°C in DMEM-HEPES. The given values of the number of RLU and SEMs resulted from three independent experiments. (B) AUC of the RLU/OD₆₀₀ of *clbA* in the three different strains. (C) Quantification of colibactin production. The production of colibactin by the *E. coli* strains and derivatives was determined by quantification of megalocytosis as previously described (15). The multiplicity of infection was 100 bacteria per cell. Three distinct genetic contexts of *E. coli* were investigated: Nissle 1917 (a probiotic strain), M1/5 (a commensal strain), and SP15 (a strain isolated from a patient with neonatal meningitis). Both cells that were not infected (NI) and cells that were infected with *E. coli* strains that do not produce colibactin gave the same quantitative results (data not shown). The given quantification values are represented as the mean values and SEMs from three independent experiments. Statistical analysis was performed by comparison of the values to the mean values obtained for wild-type (WT) strains using two-way ANOVA and the Bonferroni posttest. ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, not significant.

AQ: O

AQ: J

and electrophoresed in 0.5× Tris-borate, pH 7.5, containing 0.2 mM MnCl₂ at 100 V. The gels were stained with ethidium bromide.

Statistical analysis. Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism (version 6.0) software. The mean with the standard error of the mean (SEM) is shown in the figures, and *P* values were calculated using a one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni posttest, unless otherwise stated. *P* values of less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Iron availability modulates *clbA* transcription. In order to test whether the promoter activities of the genes located in the *pks* island (see Fig. S1A in the supplemental material) were dependent on iron availability, *E. coli* strain Nissle 1917 harboring transcriptional luciferase fusions with the genes *clbA*, *clbB*, *clbQ*, and *clbR*, four genes involved in colibactin biosynthesis, were studied (Table 1; see also Fig. S1A and B) (22). These strains were grown in chemically defined DMEM-HEPES, DMEM-HEPES supplemented with 100 μM FeCl₃, and DMEM-HEPES supplemented with an iron chelator, 8-hydroxyquinoline (8-HQ; 40 μM). The ranges of concentrations of the chelator and the iron supplement were an-

alyzed, and the highest concentrations of substances which did not alter bacterial growth were chosen. The transcription rates of the genes *clbA*, *clbB*, *clbQ*, and *clbR* were determined as the number of OD₆₀₀-standardized relative luminescence units (RLU) (Fig. 1).

This analysis revealed that only *clbA* was significantly transcribed in DMEM-HEPES, as previously reported (22) (compare Fig. 1A to Fig. 1B to D). During the bacterial growth kinetics, a continuous increase in bioluminescence emission was observed to reach a maximal value at early stationary phase of growth, followed by a decrease of transcription (Fig. 1A).

The transcription of the genes *clbB*, *clbQ*, and *clbR* was not significantly modified when the culture medium was iron depleted (DMEM-HEPES supplemented with 40 μM 8-HQ) or iron replete (DMEM-HEPES supplemented with 100 μM FeCl₃) (Fig. 1B, C, and D, respectively). In contrast, under iron-depleted conditions, the expression of *clbA* was enhanced and maintained longer than that in DMEM-HEPES (Fig. 1A). Under iron-supplemented conditions, *clbA* transcription was strongly repressed (Fig. 1A). Calculation of the area under the curve (AUC) of the relative number of OD₆₀₀-standardized relative luminescence units (RLU/

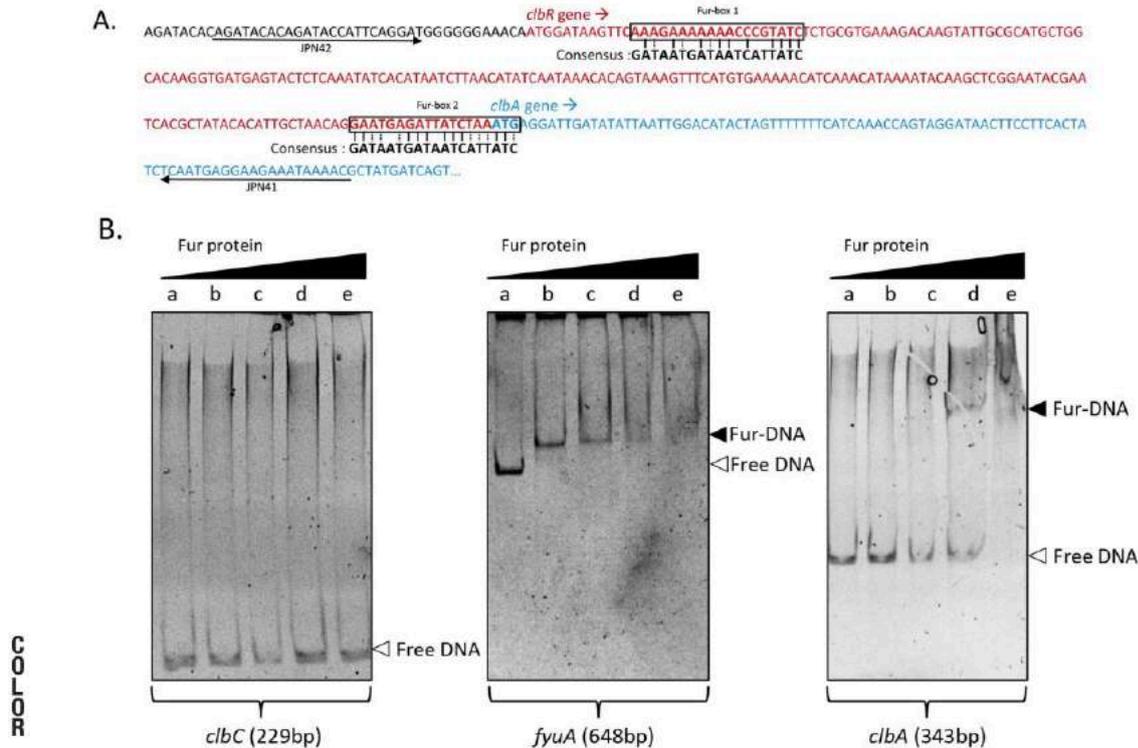


FIG 5 Fur binds to the *clbA* promoter. (A) Identification and localization of the two putative Fur boxes located upstream of *clbA*. (B) EMSA was performed in the presence of 0 μ M (lanes a), 0.25 μ M (lanes b), 0.5 μ M (lanes c), 1 μ M (lanes d), and 4 μ M (lanes e) Fur protein and 10 ng of the PCR product amplified with primers JPN41/JPN42. Three PCR products were tested: a negative control (*clbC*, 229 bp), a positive control (*fyuA*, 648 bp), and the promoter region upstream of *clbA* (343 bp).

OD₆₀₀) confirmed the iron-dependent differential *clbA* expression (Fig. 1E). Supplementation with an alternative iron chelator (desferrioxamine [DFO], 0.2 μ M) or an alternative iron source (FeSO₄, 100 μ M) resulted in similar patterns (see Fig. S2 in the supplemental material).

In order to test whether other divalent metals could influence *clbA* transcription, we monitored the expression of *clbA* in strain Nissle 1917 *clbA-lux* grown in DMEM-HEPES supplemented with copper (CuCl₂, 100 μ M) or magnesium (MgSO₄, 100 μ M) (Fig. 2). This revealed that the transcription of *clbA* was not altered in the presence of Mg²⁺ or Cu²⁺.

Altogether, these results show that *clbA* transcription is regulated by iron availability in the medium.

The iron-dependent transcription of *clbA* is independent of the LuxR-like protein ClbR. The gene *clbR* encodes a LuxR-like protein that exhibits a helix-turn-helix DNA-binding motif, which is suspected to be a regulator of colibactin biosynthesis (22). Moreover, cotranscription was previously demonstrated for the genes *dbR* and *clbA* in DMEM-HEPES medium with 5% fetal bovine serum (22). Our results described above showed that only *clbA* transcription and not *clbR* transcription is regulated by iron. To test whether ClbR is

involved in the iron-dependent regulation of *clbA*, the *clbA* gene was transcriptionally fused with an alternative reporter gene, i.e., the *Venus* gene (coding for a variant of yellow fluorescent protein of *Aequorea victoria*) in plasmid pBAD33-T7-*Venus* to produce pBAD33-T7-*clbA*. The *clbR* gene was inactivated to produce plasmid pBAD33-T7-*clbA* Δ *clbR*. The resulting plasmids, pBAD33-T7-*clbA* and pBAD33-T7-*clbA* Δ *clbR*, were transformed into strain Nissle 1917 Δ *clbA*. Monitoring of the fluorescence of the Venus protein transcriptionally fused with the *clbA* gene in strain Nissle 1917 Δ *clbA* + pBAD33-T7-*clbA* confirmed the iron-dependent regulation of *clbA* (Fig. 3A and B). Monitoring of the fluorescence of strain Nissle 1917 Δ *clbA* + pBAD33-T7-*clbA* Δ *clbR* under iron-supplemented and iron-chelated conditions revealed that *clbA* transcription was regulated by the iron concentration in the absence of functional ClbR (Fig. 3A and C). These results show that ClbR is not involved in the iron-dependent regulation of *clbA*.

Fur positively regulates the production of colibactin. Because the global response to iron availability in bacteria relies on the ferric uptake regulator (Fur) protein, we tested whether the iron-dependent regulation of *clbA* transcription was mediated by Fur. We mutated the *fur* gene in strain Nissle 1917 *clbA-lux*. The com-

COLOR

12

AQ:K
E3

Tronnet et al.

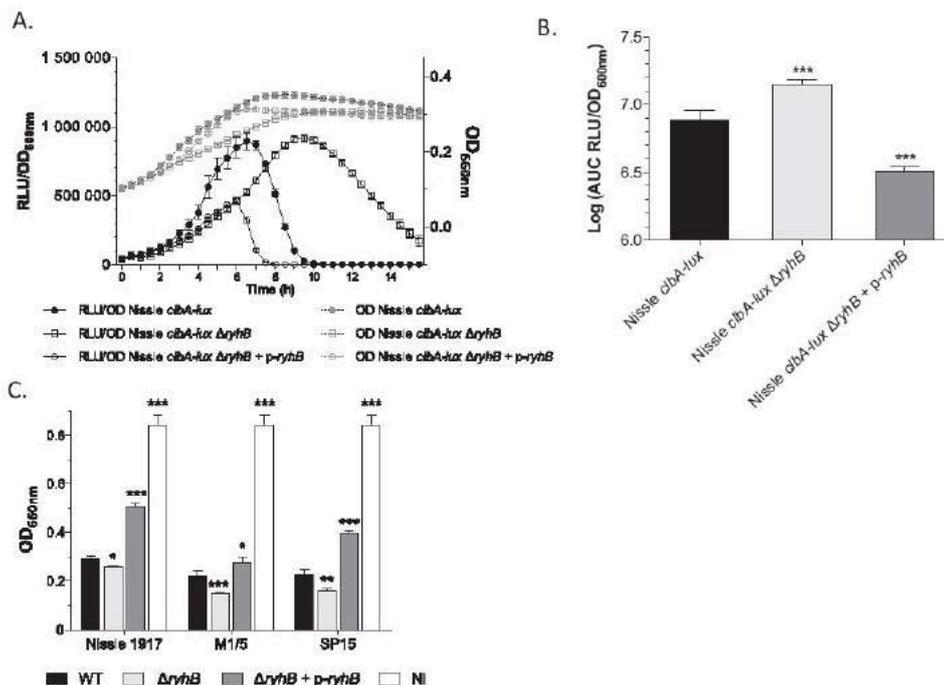


FIG 6 RyhB regulates the transcription of *clbA* and colibactin biosynthesis. (A) Growth curves (OD₆₀₀) and the RLU/OD₆₀₀ of strains Nissle 1917 *clbA-lux*, Nissle 1917 *clbA-lux ΔryhB*, and Nissle 1917 *clbA-lux ΔryhB + p-ryhB* grown at 37°C in DMEM-HEPES. The given values are the mean number of RLU and SEMs from three independent experiments. (B) AUC of the RLU/OD₆₀₀ of *clbA* in the three different strains. (C) Quantification of colibactin production. The production of colibactin by *E. coli* strains and its derivatives was determined by quantification of megalocytosis as previously described (14). The multiplicity of infection was 100 bacteria per cell. Three distinct genetic contexts of *E. coli* were investigated: Nissle 1917 (a probiotic strain), M1/5 (a commensal strain), and SP15 (a strain isolated from a patient with neonatal meningitis). Both cells that were not infected (NI) and cells that were infected with *E. coli* strains that do not produce colibactin gave the same quantitative results (data not shown). The given quantification values are represented as mean values and SEMs from three independent experiments. Statistical analysis was performed by comparison of the values to the mean values obtained for wild-type strains using two-way ANOVA and the Bonferroni posttest. ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

F4

plemented strain Nissle 1917 *clbA-lux Δfur + p-fur*, where the plasmid-borne wild-type *fur* gene was transformed into strain Nissle 1917 *clbA-lux Δfur*, was also constructed (Table 1). Monitoring of the expression of *clbA* in the resulting strains (Fig. 4A and B) revealed that the transcription of *clbA* was significantly decreased in the strain in which *fur* was mutated (Fig. 4A and B). Transformation of the strain in which *fur* was mutated with a plasmid carrying the functional wild-type *fur* gene (Fig. 4A and B) totally restored the expression of *clbA*. This indicates that the transcription of *clbA* is positively regulated by Fur.

Since ClbA is required for the production of colibactin, the role of Fur in the synthesis of colibactin was then investigated. Eukaryotic cells were infected with *pks*⁺ *E. coli* strains in which *fur* was mutated or not. Three different genetic contexts were analyzed: strains Nissle 1917 (a probiotic strain), M1/5 (a commensal strain), and SP15 (a pathogenic strain isolated from a patient with neonatal meningitis) (Table 1). The genotoxic effect of colibactin was monitored by quantification of megalocytosis, as previously described (14). This revealed that all the *Δfur* mutants displayed a genotoxicity significantly reduced compared to that of the wild-

type strains (Fig. 4C). Transformation of the strains in which *fur* was mutated with a plasmid carrying the functional wild-type *fur* gene resulted in restoration of the megalocytosis phenotype (Fig. 4C). Altogether, these results evidence that Fur positively regulates colibactin production.

To determine whether Fur could regulate *clbA* directly and/or indirectly, we investigated a putative direct binding of Fur to *clbA*. We detected two putative Fur-binding sites in the DNA sequence of the *clbA* promoter (Fig. 5A). We tested whether purified Fur protein bound to its putative binding sites in the *clbA* promoter region (Fig. 5B). EMSA showed that migration of the 343-bp DNA fragment was retarded when it was incubated with the Fur protein. This suggests that Fur can regulate *clbA* expression through direct binding.

RyhB negatively regulates the production of colibactin. Because the second major regulator of bacterial iron metabolism is the small regulatory noncoding RNA RyhB, we investigated whether RyhB was involved in the iron-mediated regulation of *clbA* transcription. The gene *ryhB* was inactivated in strain Nissle 1917 *clbA-lux*, and the complemented strain was also engineered

zii01216/zii1880d16z xppws S=1 10/15/16 2:13 4/C Fig: 5,7 ArtID:00659-16 NLM: research-article free-access CE: MKH

Iron Homeostasis Regulates Colibactin Genotoxicity

A.

clbA 5' A UUUU U A AAAAA AUUUUUUU ACCUUUUCC AGA UA C A ACU GCUU U GAUA A 3'
 UAGU CC C UUUUGG AAG UA AUACU AGA CAGU AGC GU UGCU UUAU UUCUC CCGA GG GUC UUGA
 RyhB 3' UUUUCG U C A UUC AU GAUGA C UC CAC UUA GC A C G CCGU CC CAG AAG AGCG 5'

B.

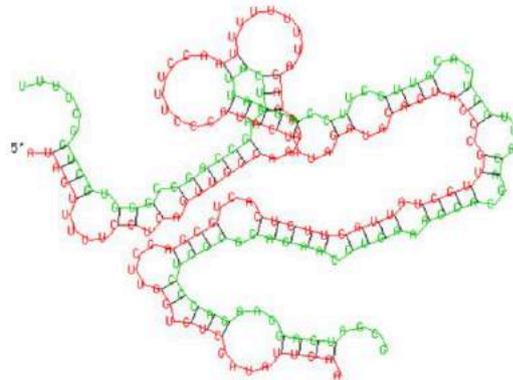


FIG 7 RyhB seems to interact directly with the *clbA* gene. The RNA Hybrid computational program predicted a region of potential interaction between RyhB and *clbA*. The nucleotide sequence involved in the interaction between *clbA* (gray) and RyhB (black) (A) and the two-dimensional structure of RyhB (green) bound to *clbA* (red) (B) are shown. The predicted pairing region with RyhB began at nucleotide 238 in the *clbA* open reading frame (minimal free energy, -51.3 kcal/mol).

COLOR

(Table 1). Monitoring of the bioluminescence in the resulting strain, Nissle 1917 *clbA-lux ΔryhB*, revealed that the level of transcription of *clbA* was enhanced and maintained longer than it was in strain Nissle 1917 *clbA-lux* (Fig. 6A and B). Overexpression of the wild-type *ryhB* gene expressed from a high-copy-number plasmid in strain Nissle 1917 *clbA-lux ΔryhB* resulted in the repression of *clbA* transcription (Nissle 1917 *clbA-lux ΔryhB+p-ryhB*) (Fig. 6A and B). These data evidence that RyhB plays a critical role in the transcription of *clbA*.

F6

The role of RyhB in the synthesis of colibactin was then investigated. Eukaryotic cells were infected with *pks*⁺ *E. coli* strains in which *ryhB* was mutated or not. The genotoxic effect of colibactin, quantified by megalocytosis, revealed that all the *ΔryhB* mutants displayed significantly increased genotoxicity compared to the wild-type strains (Fig. 6C). Overexpression of *ryhB* in strains in which the *ryhB* gene was mutated resulted in a decrease in the level of the colibactin-associated genotoxic effect (Fig. 6C). Altogether, these results evidence that RyhB negatively regulates colibactin production under these conditions.

F7

To determine whether RyhB could regulate *clbA* directly and/or indirectly, we investigated a putative direct pairing of RyhB to the *clbA* promoter. The RNA Hybrid computational program (23) predicted a region of potential pairing between RyhB and *clbA* (Fig. 7). The region of pairing with *clbA* was located 238 to 344 nucleotides downstream from the translational start (minimal free energy, -51.3 kcal/mol) (Fig. 7) in the reading frame of *clbA*. This suggests that *ryhB* could regulate *clbA* through direct binding.

DISCUSSION

This work highlights that the transcription of *clbA*, the gene encoding the PPTase involved in colibactin production, is regulated

by iron availability (see our model in Fig. 8). Therefore, this work provides new insights into the transcriptional regulation of *clbA*, as only one study on its regulation has been published previously (22). In addition to carbon source and growth phase (22), our work demonstrates that *clbA* is regulated by iron availability. Moreover, this regulation appears to be independent of ClbR, the LuxR-like protein predicted to regulate colibactin biosynthesis (22), although the *clbR* gene was demonstrated to be coexpressed with *clbA* under particular culture conditions (22). This suggests that *clbA* could be expressed from a second promoter specifically activated under specific conditions of iron availability. This iron-independent regulation of *clbA* transcription could constitute a fitness advantage for the bacteria, as we previously demonstrated that ClbA can also sustain siderophore biosynthesis (20).

This work highlights that Fur is positively involved in the production of the virulence factor colibactin through the regulation of *clbA*. Fur is a global transcriptional regulator that controls the transcription of over 90 genes involved in iron uptake, storage, and metabolism. Only a few studies have reported the involvement of Fur in the regulation of the biosynthesis of toxins in *E. coli*. The *stx* genes, encoding Shiga toxin in enterohemorrhagic *E. coli* (24, 25), and *hly* plasmids, encoding hemolysin (26), are directly regulated by Fur. In addition to its well-known role as a repressor, Fur was characterized as a positive regulator of gene expression, such as the expression of *acuA*, *fumA*, *finA*, *bfr*, and *sodB* (27).

Our work also evidenced that RyhB regulates *clbA* transcription, as we observed that *clbA* transcription was upregulated when the *ryhB* gene was inactivated, demonstrating that *clbA* is down-regulated by RyhB. RyhB is a small RNA that recruits RNase E and facilitates the degradation of mRNA targets (27, 28). Whereas only a few studies have demonstrated the impact of RyhB on virulence

Tronnet et al.

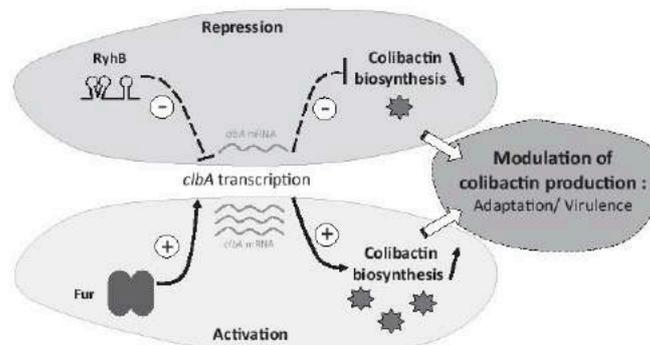


FIG 8 Model for the regulation of the transcription of *clbA* by Fur and RyhB. The biosynthesis of the genotoxin colibactin requires the enzymatic activity of the PPTase ClbA. The transcription of *clbA* is dependent on both the ferric uptake regulator (Fur) and the small regulatory noncoding RNA RyhB. This makes iron a key environmental factor contributing to the regulation of colibactin production.

in pathogenic *E. coli*, for instance, through siderophore production (29), several studies have demonstrated that this sRNA is implicated in the virulence-associated processes of other pathogenic bacteria, such as *Shigella flexneri* (2) or *Shigella dysenteriae* (30). This study provides new evidence that RyhB is involved in the production of a virulence factor in pathogenic *E. coli* through the regulation of *clbA* transcription, which leads to the modulation of colibactin production.

Here we demonstrated that modulation of the expression of *clbA* via regulators of iron homeostasis leads to the modulation of colibactin production. The mutation of *ryhB* in a colibactin-producing *E. coli* strain leads to an increase in the level of colibactin production, whereas the mutation of *fur* results in a decrease in the level of colibactin production in three different genetic contexts of *E. coli*, in which the strains belonged to the B2 phylogenetic group. We confirmed that this regulation occurred in three different strains; however, the quantitative differences observed could be explained by the genetic diversity between strains. Colibactin was demonstrated to be a virulence factor, for example, in neonatal systemic infections (19), but it is also associated with the development of colorectal cancer (31–33). The fact that colibactin is regulated by the two major regulators of iron homeostasis could link iron availability in the gut and blood and *E. coli*-mediated carcinogenesis and systemic infections, respectively. Moreover, the main reservoir of *E. coli* is the intestine and, more precisely, the colon. A recent publication confirmed the emergence of the B2 group of *E. coli* in developed countries (34). Given the existence of a gradient of iron concentration from the lumen to the intestinal epithelial cell, it is conceivable that the fine-tuning of *clbA* expression allows the production of colibactin when the pathogenic *E. coli* isolate is located in an appropriate site in the gut. This iron-dependent regulation could be one reason for the emergence of the B2 group *E. coli* strains, as we know that there is cross talk between colibactin and siderophores. Integration of the regulation of virulence factors, such as siderophores and colibactin, into networks that respond to specific environmental signals, such as the local iron concentration and the balance between Fur and RyhB, could result in the accurate production of colibactin and siderophores, so that the bacteria can adapt to the competitive environment in the gut.

Further understanding of how *E. coli* senses environments to coordinate the expression of *clbA* and the mechanism of regulation of the biosynthesis of these virulence factors may uncover novel pathways for the development of potential targets against this pathogenic enterobacterium.

ACKNOWLEDGMENTS

We have no conflict of interest to declare.

We sincerely thank Charles M. Dozois for providing us with strain MG1655 Δ *ryhB*.

FUNDING INFORMATION

This work, including the efforts of Sophie Tronnet, Christophe Garcia, Eric Oswald, and Patricia Martin, was funded by ANR (ANR-13-BSV3-0015-02 and ANR-13-BSV1-0028-01). This work, including the efforts of Sophie Tronnet, Christophe Garcia, Eric Oswald, and Patricia Martin, was funded by INCA (INCA-PLBIO13-123). This work, including the efforts of Nadine Rehm and Ulrich Dobrindt, was funded by IZKF (Dob2/013/12).

REFERENCES

- Hood MI, Skaar EP. 2012. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol* 10:525–537. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2836>.
- Oglesby AG, Murphy ER, Iyer VR, Payne SM. 2005. Fur regulates acid resistance in *Shigella flexneri* via RyhB and *ydeP*. *Mol Microbiol* 58:1354–1367. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04920.x>.
- Troxell B, Hassan HM. 2013. Transcriptional regulation by ferric uptake regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* 3:59. <https://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2013.00059>.
- Porcheron G, Dozois CM. 2015. Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and RyhB as major regulators of bacterial pathogenicity. *Vet Microbiol* 179:2–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.03.024>.
- Butcher J, Sarvan S, Brunzelle JS, Couture J-F, Stintzi A. 2012. Structure and regulon of *Campylobacter jejuni* ferric uptake regulator Fur define apo-Fur regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:10047–10052. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1118321109>.
- Papenfort K, Vanderpool CK. 2015. Target activation by regulatory RNAs in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 39:362–378. <http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuv016>.
- Bobrovskyy M, Vanderpool CK, Richards GR. 2015. Small RNAs regulate primary and secondary metabolism in Gram-negative bacteria. *Microbiol Spectr* 3:MBP-0009-2014. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.MBP-0009-2014>.
- Miethke M, Marahiel MA. 2007. Siderophore-based iron acquisition and

pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:413–451. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00012-07>.

9. Garénaux A, Caza M, Dozois CM. 2011. The ins and outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 153:89–98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.023>.
10. Brumbaugh AR, Smith SN, Subashchandrabose S, Himpf SD, Hazen TH, Rasko DA, Mobley HLT. 2015. Blocking yersiniabactin import attenuates extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in cystitis and pyelonephritis and represents a novel target to prevent urinary tract infection. *Infect Immun* 83:1443–1450. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.02904-14>.
11. Walsh CT. 2008. The chemical versatility of natural-product assembly lines. *Acc Chem Res* 41:4–10. <http://dx.doi.org/10.1021/ar700041a>.
12. Beld J, Sonnenschein EC, Vickery CR, Noel JP, Burkart MD. 2014. The phosphoantethenyl transferases: catalysis of a post-translational modification crucial for life. *Nat Prod Rep* 31:61–108. <http://dx.doi.org/10.1039/C3NP70054B>.
13. Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453–1462. <http://dx.doi.org/10.1126/science.277.5331.1453>.
14. Putze J, Hennequin C, Nougayrède JP, Zhang W, Homburg S, Karch H, Bringer MA, Fayolle C, Carniel E, Rabsch W, Oelschlaeger TA, Oswald E, Forestier C, Hacker J, Dobrindt U. 2009. Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family *Enterobacteriaceae*. *Infect Immun* 77:4696–4703. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00522-09>.
15. Nougayrède J-P, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, Buchrieser C, Hacker J, Dobrindt U, Oswald E. 2006. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 313:848–851. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1127059>.
16. Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrède J-P. 2010. *Escherichia coli* induces DNA damage *in vivo* and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:11537–11542. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1001261107>.
17. Payros D, Secher T, Boury M, Brehin C, Ménard S, Salvador-Cartier C, Cuevas-Ramos G, Watrin C, Marcq I, Nougayrède J-P, Dubois D, Bedu A, Garnier F, Clermont O, Denamur E, Plaisancié P, Theodorou V, Fioramonti J, Olier M, Oswald E. 2014. Maternally acquired genotoxic *Escherichia coli* alters offspring's intestinal homeostasis. *Gut Microbes* 5:313–325. <http://dx.doi.org/10.4161/gmic.28932>.
18. Marcq I, Martin P, Payros D, Cuevas-Ramos G, Boury M, Watrin C, Nougayrède J-P, Olier M, Oswald E. 2014. The genotoxin colibactin exacerbates lymphopenia and decreases survival rate in mice infected with septicemic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 210:285–294. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiu071>.
19. McCarthy AJ, Martin P, Cloup E, Stabler RA, Oswald E, Taylor PW. 2015. The genotoxin colibactin is a determinant of virulence in *Escherichia coli* K1 experimental neonatal systemic infection. *Infect Immun* 83:3704–3711. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00716-15>.
20. Martin P, Marcq I, Magistro G, Penary M, Garcie C, Payros D, Boury M, Olier M, Nougayrède J-P, Audebert M, Chalut C, Schubert S, Oswald E. 2013. Interplay between siderophores and colibactin genotoxin biosynthetic pathways in *Escherichia coli*. *PLoS Pathog* 9:e1003437. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003437>.
21. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6640–6645. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.120163297>.
22. Homburg S, Oswald E, Hacker J, Dobrindt U. 2007. Expression analysis of the colibactin gene cluster coding for a novel polyketide in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 275:255–262. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00889.x>.
23. Krüger J, Rehmsmeier M. 2006. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res* 34:W451–W454. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkl243>.
24. Payne SM, Wyckoff EE, Murphy ER, Oglesby AG, Boulette ML, Davies NML. 2006. Iron and pathogenesis of *Shigella*: iron acquisition in the intracellular environment. *Biometals* 19:173–180. <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-005-4577-x>.
25. Tobe T, Yen H, Takahashi H, Kagayama Y, Ogasawara N, Oshima T. 2014. Antisense transcription regulates the expression of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence regulatory gene *ler* in response to the intracellular iron concentration. *PLoS One* 9:e101582. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0101582>.
26. Grüning HM, Rutsch D, Schoch C, Lebek G. 1987. The chromosomal *fur* gene regulates the extracellular haemolytic activity encoded by certain *hly* plasmids. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* 266:231–238.
27. Massé E, Vanderpool CK, Gottesman S. 2005. Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187:6962–6971. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.20.6962-6971.2005>.
28. Sobrero P, Valverde C. 2012. The bacterial protein Hfq: much more than a mere RNA-binding factor. *Crit Rev Microbiol* 38:276–299. <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2012.664540>.
29. Porcheron G, Habib R, Houle S, Caza M, Lépine F, Daigle F, Massé E, Dozois CM. 2014. The small RNA RyhB contributes to siderophore production and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 82:5056–5068. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.02287-14>.
30. Murphy ER, Payne SM. 2007. RyhB, an iron-responsive small RNA molecule, regulates *Shigella dysenteriae* virulence. *Infect Immun* 75:3470–3477. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00112-07>.
31. Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, Tomkovich S, Uronis JM, Fan T-J, Campbell BJ, Abujamel T, Dogan B, Rogers AB, Rhodes JM, Stintzi A, Simpson KW, Hansen JJ, Keku TO, Fodor AA, Jobin C. 2012. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 338:120–123. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1224820>.
32. Dalmasso G, Cougnoux A, Delmas J, Darfeuille-Michaud A, Bonnet R. 2014. The bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by modifying the tumor microenvironment. *Gut Microbes* 5:675–680. <http://dx.doi.org/10.4161/19490976.2014.969989>.
33. Cougnoux A, Dalmasso G, Martinez R, Buc E, Delmas J, Gibold L, Sauvanet P, Darcha C, Déchelotte P, Bonnet M, Pezet D, Wodrich H, Darfeuille-Michaud A, Bonnet R. 2014. Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut* 63:1932–1942. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305257>.
34. Massot M, Daubié A-S, Clermont O, Jauréguy F, Couffignal C, Dahbi G, Mora A, Blanco J, Branger C, Mentré F, Eddi A, Picard B, Denamur E, the COLVILLE Group. 2016. Phylogenetic, virulence and antibiotic resistance characteristics of commensal strain populations of *Escherichia coli* from community subjects in the Paris area in 2010 and evolution over 30 years. *Microbiology* 162:642–650. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.000242>.
35. Johnson JR, Oswald E, O'Bryan TT, Kuskowski MA, Spanjaard L. 2002. Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal bacterial meningitis in The Netherlands. *J Infect Dis* 185:774–784. <http://dx.doi.org/10.1086/339343>.

CHAPITRE II : LA SUPPLÉMENTATION EN FER INHIBE LA SYNTHÈSE DE LA COLIBACTINE PAR LES *ESCHERICHIA COLI* PATHOGÈNES VIA UNE VOIE FUR/RyHB NON CANONIQUE

Dans les pays industrialisés, un nombre important d'enfants souffre d'anémies, et il est alors souvent préconisé une supplémentation de l'alimentation en fer. La porte d'entrée unique du fer alimentaire dans l'organisme est l'intestin, réservoir primaire de *E. coli*. Les conséquences d'une supplémentation en fer sur l'organisme sont peu connues. Cependant, elle peut entraîner une modification importante du microbiote, et également augmenter la virulence de certains pathogènes [45,315].

Cette étude se propose d'analyser la régulation de la biosynthèse de la colibactine en présence de fer, afin de comprendre en partie les conséquences d'une supplémentation en fer dans l'alimentation sur le développement de pathologies associées à la colibactine.

L'utilisation d'un système rapporteur de la transcription (fusion luciférase) combinée à une approche de microbiologie moléculaire a montré que la transcription du gène *clbA* et la biosynthèse de la colibactine diminuaient en présence de fer. Cette diminution est observée à la fois dans une souche de *E. coli* mutée pour le gène *ryhB* ou pour le gène *fur* mais également dans une souche mutée pour ces deux régulateurs clés de l'homéostasie du fer à la fois. Ces résultats montrent que la régulation de la biosynthèse de la colibactine en fonction du fer peut se faire indépendamment de RyhB et Fur, et implique un régulateur transcriptionnel supplémentaire que nous n'avons pas identifié.

En conclusion, cette étude met en évidence un mécanisme de régulation atypique faisant intervenir ces deux régulateurs, et a permis d'identifier l'existence d'un acteur supplémentaire dans la régulation de la colibactine par le fer.

En supposant qu'il existe un gradient de concentration en fer dans l'intestin, la régulation fine de la biosynthèse de la colibactine, notamment par des signaux environnementaux, pourrait permettre à la bactérie une meilleure adaptation à l'environnement compétitif de l'intestin.

Ces résultats sont rapportés dans l'article « High iron supply inhibits the synthesis of the genotoxin colibactin by pathogenic *Escherichia coli* through a non-canonical Fur/RyhB-mediated pathways » soumis pour publication dans la revue « Journal of Bacteriology ».

1 **High iron supply inhibits the synthesis of the genotoxin colibactin by pathogenic**
2 ***Escherichia coli* through a non-canonical Fur/RyhB-mediated pathway**

3

4 Running title: iron and colibactin production

5

6 Sophie Tronnet^{1,2}, Christophe Garcia^{1,2,3}, Alexander O. Brachmann⁴, Jörn Piel⁴, Eric
7 Oswald^{1,2,3*#}, Patricia Martin^{1,2,3}

8

9 ¹ IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRA, ENVT, UPS, Toulouse, France

10 ² Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France

11 ³ CHU Toulouse, Service de Bactériologie-Hygiène, Toulouse, France

12 ⁴ Institute of Microbiology, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH), Zurich, Switzerland

13

14 * Corresponding author

15 E-mail: eric.oswald@inserm.fr (EO)

16

17 # Correspondent footnote: eric.oswald@inserm.fr

18

19

20

21

22

23

24

25

26 **Abstract**

27 Iron deficiency is the main cause of malnutrition in the world. Usual strategies for anaemia
28 correction are iron supplementation and iron fortification of foods. However, the long-term
29 consequences and risks associated with high iron supply are not all known.

30 The genotoxin colibactin is a secondary metabolite produced by a variety of pathogenic
31 Enterobacteria, and is associated with colon cancer development and acute systemic infections.

32 The colibactin biosynthesis requires the enzymatic activity of the phosphopantetheinyl
33 transferase ClbA. We recently evidenced that two master regulators of bacterial iron
34 homeostasis, *i.e.* the ferric uptake regulator (Fur) and the small regulatory non-coding RNA
35 RyhB, were involved in the regulation of the *clbA* transcription and of the colibactin production.

36 In this study we investigated the impact of high iron supply on *clbA* transcription and colibactin
37 production in wild type, Δ *ryhB*, Δ *fur* and Δ *ryhB* Δ *fur* strains. This revealed that high iron
38 resulted in decreased synthesis of the genotoxin colibactin through both pathways dependent
39 and independent of Fur/RyhB.

40

41 **Importance**

42 This work highlights the complex regulatory mechanism that controls an important bacterial
43 virulence and carcinogenesis factor by regulators of bacterial iron homeostasis, and provides
44 insights into the consequences associated with iron supplementation on human digestive health.

45

46 **Introduction**

47 Iron deficiency is common in infancy, even in industrialized countries. Breast milk and cow
48 milk naturally contain little iron. Improved growth, significant increase in hemoglobin levels
49 and decreased anemia are associated with iron enriched diet in young children (1-3). However,
50 the long-term consequences and risks associated with iron supplementation are not all known.

51 Iron supplementation could indeed have side effects on health. For instance, anemic African
52 children were reported to carry in their feces an unfavorable ratio of Enterobacteriaceae
53 (potentially pathogenic) versus Bifidobacteria and Lactobacilli (beneficial bacteria). This ratio
54 becomes even more unfavorable when children are fed an iron-enriched food (4). Besides, oral
55 iron supplementation could, in addition to inducing pathogenic overgrowth, also increase the
56 virulence of enteric pathogens (5).

57 The regulation of iron homeostasis in bacteria mainly relies on ferric uptake regulator (Fur)
58 protein and the small regulatory non-coding RNA (sRNA) RyhB (6-8). Fur is a global
59 transcriptional regulator that controls the transcription of over 90 genes involved in iron uptake,
60 storage and metabolism. Fur is a well-known repressor. However, a growing literature reports Fur
61 as an activator (7, 9). Fur has been shown to play an important role in the modulation of bacterial
62 virulence (10-14). Bacterial small regulatory RNA (sRNAs) are commonly known to repress
63 gene expression by base pairing to target mRNAs. In contrast, a growing number of examples
64 of translational activation and mRNA stabilization by sRNAs have now been documented (15).
65 Although Fur and iron directly regulate sRNA RyhB (16, 17), strong evidence suggests that
66 RyhB itself is sufficient to influence the level of free intracellular iron (16). RyhB was shown
67 to be implicated in virulence-associated processes in pathogenic bacteria such as *Shigella flexneri*
68 (18), *S. dysenteriae* (19), *Listeria monocytogenes* (20) or *Escherichia coli* (21).

69 It is observed over the last 30 years a change in the composition of commensal *E. coli*
70 population in industrialized countries, with an increase in the phylogenetic group B2 (22,
71 23). Genetic analysis of different *E. coli* strains showed that those of the phylogenetic group
72 B2 have developed a greater ability to acquire iron (24).

73 Colibactin is a toxin synthesized by a diversity of pathogenic Enterobacteria, including
74 approximately 50% of the *E. coli* stains that belong to the phylogenetic group B2 (25). This
75 genotoxin induces DNA double strand breaks, senescence, chromosomal abnormalities in

76 enterocytes both *in vitro* and *in vivo* (26-28), and constitutes a risk factor for the onset of colon
77 tumor genesis (29). Colibactin also exacerbates the development of systemic pathologies such
78 as sepsis (30) and neonatal meningitis (31). The synthesis of colibactin relies on the *pks* gene
79 cluster (25) and requires the enzymatic activity of the phosphopantetheinyl transferase ClbA
80 that is encoded on the *pks* island. Recently we showed that the transcription of *clbA* and the
81 production of colibactin were regulated by Fur and RyhB (32).

82 Here, we addressed the question of the role of high iron supply on the carcinogenicity potential
83 of *E. coli* producing colibactin. We demonstrate that high iron inhibits the production of
84 colibactin genotoxin through a complex regulatory mechanism that involves major regulators
85 of bacterial iron homeostasis. This work provides insights into the consequences of high iron
86 supply on human digestive health.

87

88 **Materials and Methods**

89

90 *Bacterial strains, mutagenesis and growth conditions*

91 Bacterial strains used in this study are listed in Table 1. For genetic manipulations, *E. coli*
92 strains were routinely grown at 37°C under shaking in 3ml of Lennox L broth (LB, Invitrogen).
93 Kanamycin (50 µg/ml) or chloramphenicol (25 µg/ml) were added to the medium when
94 required. Inactivation of *E. coli* genes was undertaken using phage λ Red recombinase (33).
95 The primers used to construct mutants are shown in Table 1. Allelic exchanges were confirmed
96 by PCR. For megalocytosis assay, genotoxicity assay and bioluminescence measurements, *E.*
97 *coli* strains were grown overnight in DMEM containing Hepes (DMEM-Hepes, Gibco, 0.034
98 µM Fe) supplemented with 100 µM FeCl₃ (20.66 µM Fe) when required, at 37°C with shaking.
99 The overnight cultures were then diluted 1:50 in DMEM-Hepes supplemented or not with FeCl₃
100 and grown until OD_{600nm} = 0.6.

101

102 *Luciferase measurements*

103 Promoter activity of gene *clbA* was determined by time-course quantification of luciferase as
104 previously described (32). *E. coli* was grown overnight in DMEM-Hepes, and subcultured into
105 DMEM-Hepes or DMEM-Hepes supplemented with FeCl₃ up to OD_{600nm} = 0.6. Hundred
106 microliter samples were then used to inoculate black 96-well plate (Greiner Bio-one) and grown
107 without shaking at 37°C in a luminometer (Tecan Infinite Pro microplate reader). Both OD_{600nm}
108 and light emission (relative light units, RLU, 6000ms aperture/sample) were recorded every 30
109 min, simultaneously.

110

111 *N-myristoyl-D-asparagine quantification by liquid chromatography/mass spectrometry*

112 Quantification of colibactin prodrug motif was performed as previously described (34). Briefly,
113 *E. coli* strain M1/5 was grown in DMEM-Hepes with or without FeCl₃ at 37°C for 18h.
114 Supernatants of cultures were obtained by centrifugation and filtered. Quantification
115 experiments were conducted with ultra-performance liquid chromatography-high
116 resolution/heated electrospray ionization mass spectrometry (UPLC-HR/HESI-MS). The data
117 were recorded on a Thermo Scientific Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass
118 Spectrometer coupled to a Dionex Ultimate 3000 UPLC. The MS was operated in positive
119 ionization mode at a scan range of 200-500 *m/z* and a resolution of 35,000. The spray voltage
120 was set to 3.5 kV, the S-lens to 35, the auxiliary gas heater temperature to 438°C and the
121 capillary temperature to 270°C. Absolute quantification was achieved by using a Schotten-
122 Baumann reaction-derived *N*-myristoyl-L-asparagine (isomer of the *N*-myristoyl-D-asparagine
123 colibactin cleavage product) as a standard. Data were obtained from undiluted cell free sample
124 supernatants, concentrations were calculated using Thermo Xcalibur 2.2 Quan Browser.

125

126 *Megalocytosis assay*

127 Colibactin induces megalocytosis in cultured eukaryotic cells, manifest as progressive
128 enlargement of the cell body and nucleus and the absence of mitosis. We quantified the extent
129 of colibactin-induced megalocytosis using a methylene blue binding assay (25). *E. coli* strains
130 were added to HeLa cells at multiplicities of infection (MOIs) of 200 and/or 100, co-cultured
131 for 4h and washed. Cells were then incubated for 72h with cell culture medium containing 200
132 µg/mL gentamicin followed by staining with methylene blue. Dye binding was determined
133 spectrophotometrically at OD₆₆₀.

134

135 *Genotoxicity assay*

136 The capacity of colibactin to engender double strand DNA breaks was determined in HeLa cells
137 by γ-H2AX immunofluorescence analysis (25); this assay monitors the phosphorylation of
138 histone H2AX, a sensitive marker of ds DNA breaks. HeLa cells (1.5×10^4 cells in 200 µl
139 Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum, 80 µg/mL
140 gentamicin and 0.1 unit/ml bovine insulin) were dispensed into 96-well cell culture plates. After
141 incubation at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 24h, the cells were washed and incubated with
142 bacteria at MOI = 50 bacteria per cell. After 4h infection at 37°C in 5% CO₂, cells were washed
143 3 times with Hank's Balanced Salts Solution and incubated at 37°C in cell culture medium for
144 3h with 200 µg/ml gentamicin. Cells were fixed in the plate with 4% paraformaldehyde and
145 processed as previously described (35). Rabbit monoclonal anti-γ-H2AX antibody #9718 (Cell
146 Signaling Technology Inc, Danvers MA) was diluted 1:500 in blocking solution and incubated
147 for 2h at room temperature. IRDyeTM 800CW-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody
148 was diluted 1:100 in blocking solution and incubated for 1 h. RedDot2 (Biotium) was used for
149 DNA labelling. DNA and γ-H2AX were visualized using an Odyssey Infrared Imaging Scanner
150 (Li-Cor ScienceTec, Les Ulis, France) using 680nm and 800nm channels for RedDot2 and

151 IRDyeTM800 respectively. Relative fluorescence units for γ -H2AX per cell (as determined by
152 γ -H2AX divided by DNA content) were divided by vehicle controls to determine percentage
153 change in phosphorylation of H2AX levels relative to control. All experiments were carried out
154 in triplicate.

155

156 *Statistical analysis*

157 Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 6.0. The mean with standard error
158 of the mean (SEM) is shown in figures, and P-values were calculated using a one-way or two-
159 way ANOVA followed by a Bonferroni post-test unless otherwise stated. A P-value of less than
160 0.05 was considered statistically significant and is denoted by *. P<0.01 is denoted by ** and
161 P<0.001 by ***, ns: not significant.

162

163 **Results**

164

165 *High iron inhibits the production of colibactin genotoxin by the wild type strain*

166 Recently we showed that the transcription of the *clbA* gene was modulated by iron (32).
167 Therefore, we assessed the impact of iron supplementation on the production of the colibactin.
168 We previously tested a panel of concentrations (1, 10, 100 and 1000 μ M) (32). A dose effect of
169 iron was observed on *clbA* expression. We chose to work with 100 μ M of FeCl₃, because with
170 this concentration the maximum response of *clbA* transcription was reached without inducing
171 toxicity in the bacteria (32).

172 The production of genotoxin colibactin was measured in wild type (WT) strain M1/5 through
173 bacteria-host cell interaction and subsequent quantification of megalocytosis (Figure 1A) and
174 histone H2AX phosphorylation (Figure 1B) which both correlate with DNA double strand
175 breaks resulting from the genotoxic effect of colibactin (25). This revealed that the

7

176 supplementation of the interaction medium (DMEM-Hepes) with FeCl₃ abrogated the
177 genotoxic effect induced by the colibactin (Figure 1A, 1B).

178 The mature colibactin genotoxin has not been fully characterized yet. However, a biosynthetic
179 by-product derived from the colibactin assembly line, *i.e.* the N-myristoyl-D-asparagine moiety,
180 has been recently characterized (36-38). This moiety is a prodrug motif that is cleaved during
181 the late activation step (39). We developed a LC-MS assay to quantitatively measure the amount
182 of N-myristoyl-D-asparagine as a means to indirectly quantify the production of the genotoxin
183 (34) by *E. coli* M1/5 (Figure 1C). The results showed that in high iron conditions, the quantity
184 of colibactin prodrug motif was abolished in the bacterial culture supernatant compared to the
185 DMEM-Hepes (Figure 1C).

186 Altogether, these data showed that high iron inhibited the synthesis of colibactin in a wild type
187 strain.

188

189 ***High iron inhibits both the transcription of *clbA* and the production of colibactin in Δfur*** 190 ***mutant strains***

191 Recently we showed that the transcription of the *clbA* gene and the production of colibactin was
192 regulated by Fur. Therefore, we assessed the impact of high iron on the Fur-dependent
193 regulation of *clbA* and colibactin.

194 *E. coli* strain Nissle 1917 harboring a transcriptional luciferase fusion with the *clbA* gene and
195 its Δfur isogenic mutant were analyzed (Table 1, 32, 40). Both strain Nissle *clbA-lux* and strain
196 Nissle *clbA-lux* Δfur were grown in chemically defined DMEM-Hepes and DMEM-Hepes
197 supplemented with FeCl₃ (100 μ M). The transcription rate of *clbA* was determined as OD_{600nm}
198 standardized-relative luminescence units (RLU) (Figure 2A). An increase of bioluminescence
199 emission was observed during the bacterial growth, to reach a maximal value at early stationary
200 phase of growth, followed by a decrease of transcription, for both strains (Figure 2A). In iron-

201 supplemented conditions, the *clbA* transcription was strongly repressed in both strain Nissle
202 *clbA-lux* and strain Nissle *clbA-lux Δfur* (Figure 2A).

203 The production of colibactin was measured in *E. coli* WT strains and *Δfur* mutant derivatives
204 through bacteria-host cell interaction and subsequent quantification of megalocytosis in the
205 absence and presence of iron supplementation (FeCl₃, 100μM, Figure 2B). Two distinct genetic
206 contexts of *E. coli* were investigated: Nissle 1917 (probiotic strain) and M1/5 (commensal
207 strain). This revealed that in high iron interaction medium, the genotoxic effect induced by the
208 colibactin was significantly diminished both in the WTs and the *Δfur* inactivated mutants.

209 Altogether, these data suggested that in *Δfur* mutants the iron-dependent *clbA* repression and
210 the resulting decreased colibactin production could occur either through RyhB in a Fur-
211 independent manner or through an additional regulator.

212

213 ***High iron inhibits both the transcription of clbA and the production of colibactin in ΔryhB***
214 ***mutant strains***

215 Recently we showed that the transcription of the *clbA* gene and the production of colibactin was
216 regulated by RyhB. Therefore, we assessed the impact of high iron on the RyhB-dependent
217 regulation of *clbA* and colibactin.

218 *E. coli* strain Nissle *clbA-lux* and its *ΔryhB* isogenic mutant were analyzed (Table 1, 32, 40).
219 Both strain Nissle *clbA-lux* and strain Nissle *clbA-lux ΔryhB* were grown in DMEM-Hepes and
220 DMEM-Hepes supplemented with FeCl₃ (100μM; Figure 3A). This revealed that in iron-
221 supplemented conditions, the *clbA* transcription was repressed in both strains Nissle *clbA-lux*
222 and Nissle *clbA-lux ΔryhB* (Figure 3A).

223 The production of colibactin was measured in *E. coli* WT strains and their *ΔryhB* mutant
224 derivatives through bacteria-host cell interaction and subsequent quantification of
225 megalocytosis in the absence and presence of iron supplementation (FeCl₃, 100μM, Figure 3B).

226 This revealed that in high iron interaction medium, the genotoxic effect induced by the
227 colibactin was significantly diminished both in the WTs and the $\Delta ryhB$ inactivated mutants.

228 Altogether, these data suggested that in a $\Delta ryhB$ mutant the iron-dependent *clbA* repression and
229 the resulting decreased colibactin production could occur through Fur in a *ryhB*-independent
230 manner, or through an additional regulator.

231

232 *A yet unknown factor is involved in the high iron-dependent regulation of colibactin*
233 *production*

234 To address the question of the potential involvement of an additional regulatory factor in the
235 regulation of colibactin, $\Delta ryhB \Delta fur$ double mutants were constructed in strains Nissle 1917
236 and M1/5, and were analyzed for their capacity to produce colibactin by quantification of
237 megalocytosis (Figure 4A). This revealed that the quantity of colibactin produced in the double
238 mutants was highly decreased, compared to the WT strains. The genotoxic effect measured in
239 the double mutants was lower than that observed for the Δfur inactivated mutants, in each
240 genetic context (Figure 4A).

241 To test the putative involvement of an additional regulatory factor in the high iron-dependent
242 control of colibactin production, megalocytosis assay was performed with the double mutants
243 $\Delta ryhB \Delta fur$ in the presence of high iron (100 μ M, Figure 4B). This revealed that the colibactin-
244 associated genotoxic effect was diminished by iron supplementation in the $\Delta ryhB \Delta fur$ mutants.
245 Altogether, these findings suggested that an additional yet unknown regulatory factor was
246 involved in the regulation of the colibactin in response to high iron conditions.

247

248 **Discussion**

249 Usual strategies for Fe-deficiency anaemia correction are Fe supplementation and Fe
250 fortification of foods. However, absorption of Fe is usually low (5–20%) and takes place mainly

251 in the duodenum, while the main fraction of Fe reaches the colon, where it might affect the gut
252 microbiota (41).

253 Our previous study (32) highlighted that the mutation of *ryhB* led to an increase of colibactin
254 production, whereas the mutation of *fur* resulted in a decrease of colibactin production in three
255 different genetic contexts of *E. coli* belonging to the B2 phylogenetic group. Here we showed that
256 high iron decreases *clbA* transcription and colibactin production in wild type, $\Delta ryhB$, Δfur and
257 $\Delta ryhB \Delta fur$ strains. This suggests an iron-dependent synthesis of the genotoxin through a non-
258 classic Fur/RyhB-mediated pathways. Nowadays, numerous reports support the four modes of
259 Fur regulation, apo- and holo-Fur activation and repression, establishing a significant deviation
260 from the classical model of Fur regulation (42). In the same manner, *ryhB* was reported to be
261 regulated in a Fur-dependent and Fur-independent manner, and to repress or activate genes (15,
262 16).

263 Colibactin is a virulence factor involved in neonatal systemic infections (31), and is also associated
264 with the development of colorectal cancer (29, 43, 44). Our work could make a link between iron
265 concentration in the gut / the blood and *E. coli*-mediated carcinogenesis / systemic infections. Given
266 the existence of a gradient of iron concentration from the lumen to the intestinal epithelial cell, it is
267 conceivable that the fine-tuning of *clbA* expression allows the production of colibactin when the
268 pathogenic *E. coli* is located in an appropriate site in the gut. This iron-dependent regulation could
269 also be a reason of the emergence of B2 group *E. coli*, as we know there is a crosstalk between
270 colibactin and siderophores (35). Integrating the regulation of virulence factors, such as
271 siderophores and colibactin, into networks that respond to specific environmental signals, such as
272 the local iron concentration and the balance between Fur and RyhB could result in an accurate
273 production of colibactin and siderophores, so that the bacteria can adapt to the competitive
274 environment that is the gut, or in the blood.

275 This work highlights the complex regulatory mechanism of an important bacterial virulence
276 and carcinogenesis factor by major regulators of bacterial iron homeostasis, and provides
277 insights into the consequences associated with high iron supply. Further understanding of how
278 *E. coli* senses environments to regulate the biosynthesis of colibactin, may uncover novel pathways
279 for the development of potential targets against this pathogenic enterobacterium.

280

281 **Acknowledgments**

282 The authors have no conflict of interest to declare.

283

284 **References**

- 285 1. **Sazawal S, Dhingra U, Dhingra P, Hiremath G, Sarkar A, Dutta A, Menon VP, Black**
286 **RE.** 2010. Micronutrient fortified milk improves iron status, anemia and growth among
287 children 1-4 years: a double masked, randomized, controlled trial. *PLoS One* **5**:e12167.
- 288 2. **Eichler K, Wieser S, Ruthemann I, Brugger U.** 2012. Effects of micronutrient fortified
289 milk and cereal food for infants and children: a systematic review. *BMC Public Health* **12**:506.
- 290 3. **Gondolf UH, Tetens I, Michaelsen KF, Trolle E.** 2013. Iron supplementation is positively
291 associated with increased serum ferritin levels in 9-month-old Danish infants. *Br J Nutr* **109**:
292 103-110.
- 293 4. **Zimmermann MB, Chassard C, Rohner F, N'Goran E K, Nindjin C, Dostal A, Utzinger**
294 **J, Ghattas H, Lacroix C, Hurrell RF.** 2010. The effects of iron fortification on the gut
295 microbiota in African children: a randomized controlled trial in Cote d'Ivoire. *Am J Clin Nutr*
296 **92**:1406-1415.
- 297 5. **Kortman GAM, Boleij A, Swinkels DW, TjalsmaH.** 2012. Iron availability increases the
298 pathogenic potential of *Salmonella Typhimurium* and other enteric pathogens at the intestinal
299 epithelial interface. *PLOS One* **7**(1):e29968

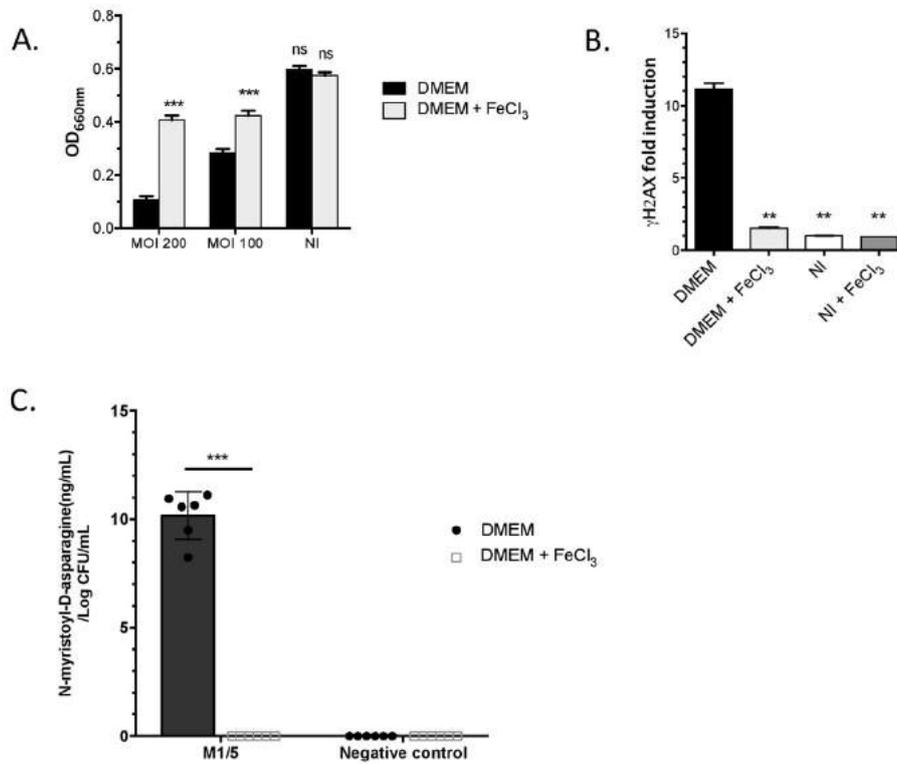
- 300 6. **Massé E, Salvail H, Desnoyers G, Arguin M.** 2007. Small RNAs controlling iron
301 metabolism. *Curr Opin Microbiol* **10**:140-5.
- 302 7. **Troxell B, Hassan HM.** 2013. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur)
303 in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* **3**:59.
- 304 8. **Porcheron G, Dozois CM.** 2015. Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and
305 RyhB as major regulators of bacterial pathogenicity. *Vet Microbiol* **179**:2-14.
- 306 9. **Yu C, Genco CA.** 2012. Fur-mediated global regulatory circuits in pathogenic *Neisseria*
307 species. *J Bacteriol* **194**:6372-81.
- 308 10. **Gancz H, Censini S, Merrell DS.** 2006. Iron and pH homeostasis intersect at the level of
309 Fur regulation in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* **74**:602-614.
- 310 11. **Payne SM, Wyckoff EE, Murphy ER, Oglesby AG, Boulette ML, Davies NML.** 2006.
311 Iron and pathogenesis of *Shigella*: iron acquisition in the intracellular environment. *Biometals*
312 *Int J Role Met Ions Biol Biochem Med* **19**:173-180.
- 313 12. **Ledala N, Sengupta M, Muthaiyan A, Wilkinson BJ, Jayaswal RK.** 2010.
314 Transcriptomic response of *Listeria monocytogenes* to iron limitation and Fur mutation. *Appl*
315 *Environ Microbiol* **76**:406-416.
- 316 13. **Torres VJ, Attia AS, Mason WJ, Hood MI, Corbin BD, Beasley FC, Anderson KL,**
317 **Stauff DL, McDonald WH, Zimmerman LJ, Friedman DB, Heinrichs DE, Dunman PM,**
318 **Skaar EP.** 2010. *Staphylococcus aureus* fur regulates the expression of virulence factors that
319 contribute to the pathogenesis of pneumonia. *Infect Immun* **78**:1618-1628.
- 320 14. **Tobe T, Yen H, Takahashi H, Kagayama Y, Ogasawara N, and Oshima T.** 2014.
321 Antisense transcription regulates the expression of the enterohemorrhagic *Escherichia coli*
322 virulence regulatory gene *ler* in response to the intracellular iron concentration. *PLoS One* **9**:
323 e101582.
- 324 15. **Papenfort K, Vanderpool CK.** 2015. Target activation by regulatory RNAs in bacteria.

- 325 FEMS Microbiol Rev **39**:362-78.
- 326 16. **Massé E, Vanderpool CK, Gottesman S.** 2005. Effect of RyhB small RNA on global iron
327 use in *Escherichia coli*. J Bacteriol **187**: 6962-6971.
- 328 17. **Sobrero P, Valverde C.** 2012. The bacterial protein Hfq: much more than a mere RNA-
329 binding factor. Crit Rev Microbiol **38**:276-299.
- 330 18. **Oglesby AG, Murphy ER, Iyer VR, Payne SM.** 2005. Fur regulates acid resistance in
331 *Shigella flexneri* via RyhB and *ydeP*. Mol Microbiol **58**:1354-1367.
- 332 19. **Murphy ER, Payne SM.** 2007. RyhB, an Iron-Responsive Small RNA Molecule,
333 Regulates *Shigella dysenteriae* Virulence. Infect Immun **75**: 3470-3477.
- 334 20. **Sesto N, Koutero M, Cossart P.** 2014. Bacterial and cellular RNAs at work during Listeria
335 infection. Future Microbiol **9**:1025-37.
- 336 21. **Porcheron G, Habib R, Houle S, Caza M, Lépine F, Daigle F, Massé E, Dozois CM.**
337 2014. The small RNA RyhB contributes to siderophore production and virulence of
338 uropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun **82**:5056-5068.
- 339 22. **Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E.** 2010. The population genetics of
340 commensal *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol **8**: 207-217.
- 341 23. **Massot M, Daubié AS, Clermont O, Jauréguy F, Couffignal C, Dahbi G, Mora A,**
342 **Blanco J, Branger C, Mentré F, Eddi A, Picard B, Denamur E, The Coliville Group.** 2016.
343 Phylogenetic, virulence and antibiotic resistance characteristics of commensal strain
344 populations of *Escherichia coli* from community subjects in the Paris area in 2010 and
345 evolution over 30 years. Microbiol **162**:642-50.
- 346 24. **Schubert S, Darlu P, Clermont O, Wieser A, Magistro G, Hoffmann C, Weinert K,**
347 **Tenaillon O, Matic I, Denamur E.** 2009. Role of intraspecies recombination in the spread of
348 pathogenicity islands within the *Escherichia coli* species. PLoS Pathog **5**:e1000257.

- 349 25. Nougayrède JP, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G,
350 Buchrieser C, Hacker J, Dobrindt U, Oswald E. 2006. *Escherichia coli* induces DNA
351 double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* **313**:848-851.
- 352 26. Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrède JP. 2010.
353 *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian
354 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:11537-11542.
- 355 27. Secher T, Samba-Louaka A, Oswald E, Nougayrède JP. 2013. *Escherichia coli*
356 producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian cells. *PLoS*
357 *One* **8**:e77157.
- 358 28. Payros D, Secher T, Boury M, Brehin C, Ménard S, Salvador-Cartier C, Cuevas-
359 Ramos G, Watrin C, Marcq I, Nougayrède JP, Dubois D, Bedu A, Garnier F, Clermont
360 O, Denamur E, Plaisancié P, Theodorou V, Fioramonti J, Olier M, Oswald E. 2014.
361 Maternally acquired genotoxic *Escherichia coli* alters offspring's intestinal homeostasis. *Gut*
362 *Microbes* **5**:313-325.
- 363 29. Arthur JC, Perez-Chanona E, Muhlbauer M, Tomkovich S, Uronis JM, Fan TJ,
364 Campbell BJ, Abujamel T, Dogan B, Rogers AB, Rhodes JM, Stintzi A, Simpson KW,
365 Hansen JJ, Keku TO, Fodor AA, Jobin C. 2012. Intestinal inflammation targets cancer-
366 inducing activity of the microbiota. *Science* **338**:120-123.
- 367 30. Marcq I, Martin P, Payros D, Cuevas-Ramos G, Boury M, Watrin C, Nougayrède JP,
368 Olier M, Oswald E. 2014. The genotoxin colibactin exacerbates lymphopenia and decreases
369 survival rate in mice infected with septicemic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **210**:285-294.
370 9:e1003437.
- 371 31. McCarthy AJ, Martin P, Cloup E, Stabler RA, Oswald E, Taylor PW. 2015. The
372 genotoxin Colibactin is a determinant of virulence in *Escherichia coli* K1 experimental neonatal
373 systemic infection. *Infect Immun* **83**:3704-3711.

- 374 32. **Tronnet S, Garcie C, Rehm N, Dobrindt U, Oswald E, Martin P.** Iron homeostasis
375 regulates the genotoxicity of *Escherichia coli* producing colibactin. *Infect Immun*, in press.
- 376 33. **Datsenko KA, Wanner BL.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in
377 *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6640-6645.
- 378 34. **Garcie C, Tronnet S, Garénaux A, McCarthy AJ, Brachmann AO, Pényary M, Houle**
379 **S, Nougayrède JP, Piel J, Taylor PW, Dozois CM, Genevaux P, Oswald E, Martin P.** 2016.
380 The stress-responsive Hsp90 chaperone is required for the production of genotoxin and
381 yersiniabactin siderophore by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **214**(6):916-24.
- 382 35. **Martin P, Marcq I, Magistro G, Penary M, Garcie C, Payros D, Boury M, Olier M,**
383 **Nougayrède JP, Audebert M, Chalut C, Schubert S, Oswald E.** 2013. Interplay between
384 siderophores and colibactin genotoxin biosynthetic pathways in *Escherichia coli*. *PLoS Pathog*
- 385 36. **Bian X, Fu J, Plaza A, Herrmann J, Pistorius D, Stewart AF, Zhang Y, Müller R.** 2013.
386 *In vivo* evidence for a prodrug activation mechanism during colibactin maturation.
387 *Chembiochem Eur J Chem Biol* **14**:1194-1197.
- 388 37. **Brotherton CA, Balskus EP.** 2013. A prodrug resistance mechanism is involved in
389 colibactin biosynthesis and cytotoxicity. *J Am Chem Soc* **135**:3359-3362.
- 390 38. **Vizcaino MI, Crawford JM.** 2015. The colibactin warhead crosslinks DNA. *Nat Chem*
391 **7**:411-7.
- 392 39. **Dubois D, Baron O, Cougnoux A, Delmas J, Pradel N, Boury M, Bouchon B, Bringer**
393 **MA, Nougayrède JP, Oswald E, Bonnet R.** 2011. ClbP is a prototype of a peptidase subgroup
394 involved in biosynthesis of nonribosomal peptides. *J Biol Chem* **286**:35562-70.
- 395 40. **Homburg S, Oswald E, Hacker J, Dobrindt U.** 2007. Expression analysis of the colibactin
396 gene cluster coding for a novel polyketide in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **275**:255-
397 262.
- 398 41. **Zimmermann MB, Hurrell RF.** 2007. Nutritional iron deficiency. *Lancet* **370**: 511–520.

- 399 42. **Butcher J, Sarvan S, Brunzelle JS, Couture JF, Stintzi A.** 2012. Structure and regulon
400 of *Campylobacter jejuni* ferric uptake regulator Fur define apo-Fur regulation. Proc Natl Acad
401 Sci U S A. **109**:10047-52.
- 402 43. **Dalmaso G, Cougnoux A, Delmas J, Darfeuille-Michaud A, Bonnet R.** 2014 The
403 bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by modifying the tumor
404 microenvironment. Gut Microbes. **5**(5):675-80.
- 405 44. **Cougnoux A, Dalmaso G, Martinez R, Buc E, Delmas J, Gibold L, Sauvanet P,**
406 **Darcha C, Déchelotte P, Bonnet M, Pezet D, Wodrich H, Darfeuille-Michaud A, Bonnet**
407 **R.** 2014 Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a
408 senescence-associated secretory phenotype. Gut **63**(12):1932-42.
- 409 45. **Olier M, Marcq I, Salvador-Cartier C, Secher T, Dobrindt U, Boury M, Bacquié V,**
410 **Pénary M, Gaultier E, Nougayrède JP, Fioramonti J, Oswald E.** 2012. Genotoxicity of
411 *Escherichia coli* Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. Gut
412 Microbes **3**:501-509.
- 413
- 414 **Figure legends**



415

416 **Figure 1. High iron inhibits the production of colibactin genotoxin by the wild type strain.**

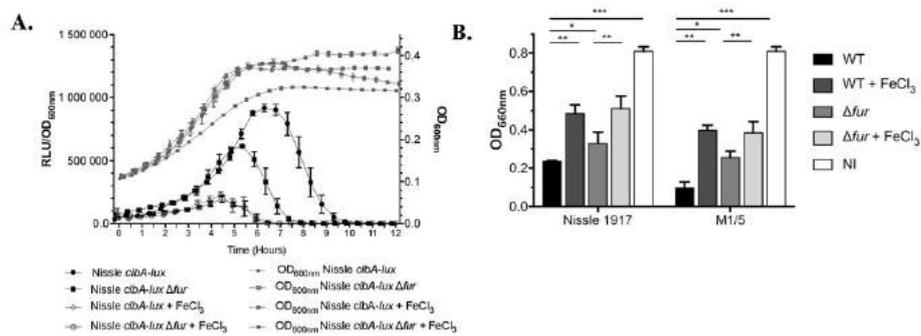
417 **A.** The production of colibactin by *E. coli* strain M1/5 was determined by quantification of
 418 megalocytosis as previously described (25). HeLa cells were infected with *E. coli*, in the
 419 presence of 100µM FeCl₃ or not, then washed 4h post infection. After infection, the cells were
 420 incubated for 72h with gentamicin before protein staining with methylene blue. The staining
 421 was quantified by acid-extraction of the methylene blue and measurement of optical density at
 422 660nm (OD_{660 nm}). Multiplicity of infection (number of bacteria per cells): MOI = 200 and 100.

423 **B.** The production of colibactin by *E. coli* strain M1/5 was determined by quantification of
 424 H2AX phosphorylation. HeLa cells were infected with *E. coli*, in the presence of 100µM FeCl₃
 425 or not, then washed 4h post infection. The cells were then incubated 3h in DMEM medium
 426 supplemented with gentamicin before fixation, then permeabilized and labeled for DNA and

18

427 phosphorylated H2AX histone (γ -H2AX) using an In-Cell Western method (35). MOI = 50. C.
 428 The colibactin prodrug motif *N*-myristoyl-D-asparagine produced by *E. coli* strain M1/5 was
 429 quantified by LC-MS. Bacteria were cultivated at 37°C for 18h in DMEM-Hepes or DMEM-
 430 Hepes supplemented with FeCl₃ (100 μ M), and *N*-myristoyl-D-asparagine was quantified in
 431 culture supernatants and pellets by LC-MS using *N*-myristoyl-l-asparagine (isomer of the *N*-
 432 myristoyl-D-asparagine colibactin prodrug motif) as a standard. The results were normalized
 433 to the bacterial biomass and are presented as quantity of *N*-myristoyl-D-asparagine (ng/ml).
 434 Data represented in the graph were obtained from three biological replicates and two
 435 independent experiments. NI: not infected. Statistical analysis: unpaired t-test. ***: $p < 0.001$,
 436 **: $p < 0.01$. ns: not significant.

437
 438



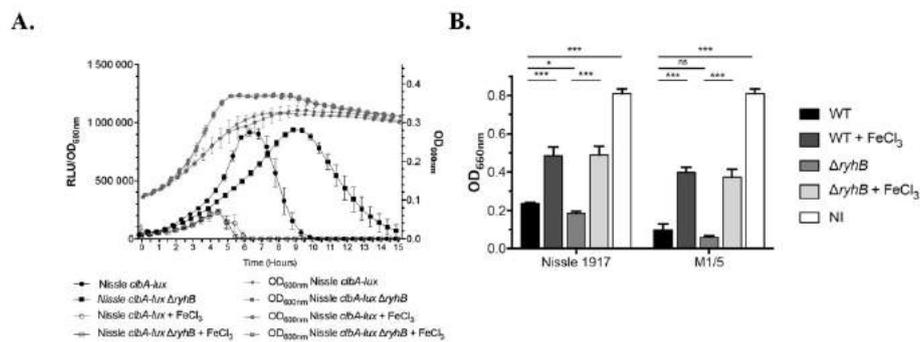
439

440 **Figure 2. High iron inhibits the transcription of *clbA* and the production of colibactin**
 441 **genotoxin in Δfur mutant strains**

442 **A.** Growth curves (OD_{600nm}) and relative OD_{600nm} standardized-relative luminescence units
 443 (RLU/OD_{600nm}) of strains Nissle *clbA-lux* and Nissle *clbA-lux Δfur* grown at 37°C in DMEM-Hepes
 444 or DMEM-Hepes supplemented with 100 μ M of FeCl₃. The given mean RLU average values with
 445 SEM result from four independent experiments. **B.** The production of colibactin by *E. coli* strains
 446 Nissle 1917 and M1/5 (wild type and Δfur) was determined by quantification of megalocytosis,

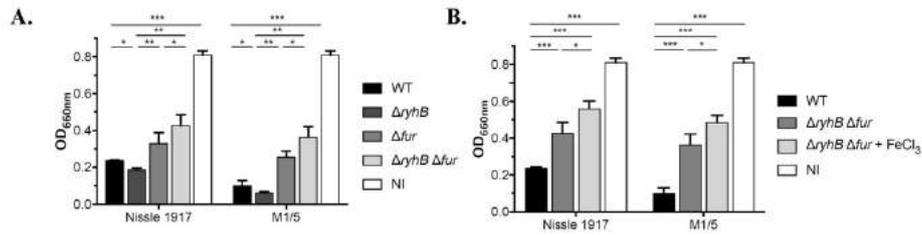
19

447 in the absence and the presence of FeCl₃ (100 μM). MOI = 200. The given quantification
 448 average values are represented as mean values and SEM and result from three independent
 449 experiments. Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA and Bonferroni post-test
 450 compared to mean values obtained for wild type strains. ****P* < 0.001; ***P* < 0.01; **P* < 0.05. NI:
 451 not infected.
 452



453
 454 **Figure 3. High iron inhibits the transcription of *clbA* and the production of colibactin**
 455 **genotoxin in *ΔryhB* mutant strains**

456 **A.** Growth curves (OD_{600nm}) and relative OD_{600nm} standardized-relative luminescence units
 457 (RLU/OD_{600nm}) of strains Nissle *clbA-lux* and Nissle *clbA-lux ΔryhB* grown at 37°C in DMEM-
 458 Hepes or DMEM-Hepes supplemented with 100 μM of FeCl₃. The given mean RLU average values
 459 with SEM result from four independent experiments. **B.** The production of colibactin by *E. coli*
 460 strains Nissle 1917 and M1/5 (wild type and *ΔryhB*) was determined by quantification of
 461 megalocytosis, in the absence and the presence of FeCl₃ (100 μM). MOI = 200. The given
 462 quantification average values are represented as mean values and SEM and result from three
 463 independent experiments. Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA and
 464 Bonferroni post-test compared to mean values obtained for wild type strains. ****P* < 0.001; **P* <
 465 0.05; ns: not significant. NI: not infected.



466

467 **Figure 4. A yet unknown factor is involved in the high iron-dependent regulation of**
 468 **colibactin production**

469 **A.** The production of colibactin by *E. coli* strains Nissle 1917 and M1/5 (wild type, $\Delta ryhB$, Δfur
 470 and $\Delta ryhB \Delta fur$) was determined by quantification of megalocytosis. MOI = 200. The given
 471 quantification average values are represented as mean values and SEM and result from three
 472 independent experiments. Statistical analysis was performed using Two-way ANOVA and
 473 Bonferroni post-test compared to mean values obtained for wild type strains. **B.** The production of
 474 colibactin by *E. coli* strains and Nissle 1917 and M1/5 (wild type and $\Delta ryhB \Delta fur$) was
 475 determined by quantification of megalocytosis. The infection of HeLa cells with *E. coli* was
 476 performed in the absence or the presence of $FeCl_3$ (100 μM). MOI = 200. *** $P < 0.001$; ** $P <$
 477 0.01; * $P < 0.05$. NI: not infected.

Table 1. Strains and primers used in this study.

<i>E. coli</i> strain		Source or reference
Nissle <i>clbA-lux</i>	Luciferase fusion of the gene <i>clbA</i> , Kan ^R	39
Nissle <i>clbA-lux</i> Δ <i>ryhB</i>	<i>ryhB</i> mutant of strain Nissle <i>clbA-lux</i> , Kan ^R Cm ^R	32
Nissle <i>clbA-lux</i> Δ <i>fur</i>	<i>fur</i> mutant of strain Nissle <i>clbA-lux</i> , Kan ^R Cm ^R	32
Nissle <i>clbA-lux</i> Δ <i>ryhB</i> Δ <i>fur</i>	<i>ryhB fur</i> double mutant of strain Nissle <i>clbA-lux</i> Kan ^R Cm ^R	This study
M1/5	Colibactin producer, commensal strain	35
M1/5 Δ <i>ryhB</i>	<i>ryhB</i> mutant of strain M1/5, Cm ^R	32
M1/5 Δ <i>fur</i>	<i>fur</i> mutant of strain M1/5, Kan ^R	32
M1/5 Δ <i>ryhB</i> Δ <i>fur</i>	<i>ryhB fur</i> double mutant of strain M1/5, Cm ^R	This study
Nissle 1917	Colibactin producer, probiotic strain	45
Nissle 1917 Δ <i>ryhB</i>	<i>ryhB</i> mutant of strain Nissle 1917, Cm ^R	32
Nissle 1917 Δ <i>fur</i>	<i>fur</i> mutant of strain Nissle 1917, Kan ^R	32
Nissle 1917 Δ <i>ryhB</i> Δ <i>fur</i>	<i>ryhB fur</i> double mutant of strain Nissle 1917, Cm ^R Amp ^R	This study
Primers		
Fur_F	CGCCCTAAAGAAAGCTGGCC	32
Fur_R	CCTTCGTGCGCATGTTTCATC	32
CMD1171_ST (<i>ryhB:cat</i>)	TTTGGGGTAAATGTCCCTTTC	32
CMD1172_ST (<i>ryhB:cat</i>)	GTGCGCATAACGAACACAAG	32

CHAPITRE III : LA CARENCE EN FER INDUIT LA REDIRECTION DE ClbA VERS LA BIOSYNTHÈSE DES SIDÉROPHORES

L'étude précédente s'intéresse à la régulation de la colibactine en présence d'une forte quantité en fer. En condition de carence en fer, la transcription de ce gène était positivement régulée. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux conséquences de cette régulation sur la biosynthèse de la colibactine en condition de carence en fer.

Dans un premier temps, l'analyse de l'effet génotoxique de bactéries produisant la colibactine sur des cellules eucaryotes a été effectuée dans un milieu de culture cellulaire classique ou carencé en fer grâce à l'ajout d'un chélateur de fer. Ces résultats ont montré qu'en condition de carence en fer, la biosynthèse de la colibactine était diminuée. La quantification du produit de clivage de la colibactine par spectrométrie de masse couplé à la chromatographie liquide (LC-MS) a permis de confirmer ces résultats.

Il a été mis en évidence par notre laboratoire l'existence d'une connexion entre la biosynthèse des sidérophores et de la colibactine, via ClbA. En effet, celle-ci peut participer à la synthèse de ces deux types de métabolites secondaires [126]. Nous avons donc quantifié les sidérophores totaux synthétisés par une souche de *E. coli* en condition de carence en fer. Les résultats montrent que la diminution de la biosynthèse de la colibactine dans ces conditions est associée à une augmentation de la production de sidérophores via ClbA. Nous faisons donc l'hypothèse que la PPTase ClbA pourrait être redirigée vers la production de sidérophores lorsqu'il y a peu de fer dans le milieu. Ceci pourrait permettre à la bactérie une meilleure adaptation à un milieu carencé en fer.

Ces résultats constituent le début d'une histoire qui met en évidence un mécanisme intéressant et le caractère pléiotrope de ClbA. Malheureusement, l'hypothèse de la redirection de ClbA vers la biosynthèse des sidérophores n'a pas été confirmée expérimentalement et le mécanisme par lequel ClbA pourrait être redirigé vers la biosynthèse des sidérophores n'a pas été identifié.

Ces résultats sont présentés sous forme d'une ébauche d'article scientifique.

Iron scarcity induces the redirection of ClbA from colibactin to siderophores biosynthesis

Sophie Tronnet^{1,2}, Christophe Garcia^{1,2,3}, Alexander O. Brachmann⁴, Jörn Piel⁴, Éric Oswald^{1,2,3}, Patricia Martin^{1,2,3}

¹ IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRA, ENVT, Toulouse, France

² Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France

³ CHU Toulouse, Service de Bactériologie-Hygiène, Toulouse, France

⁴ Institute of Microbiology, Eidgenössische Technische Hochschule, Zurich, Switzerland

Introduction

Adaptation to nutrient limitation is a key driver of microbial fitness. Iron is an essential nutrient for bacterial growth, with only rare documented exceptions (1, 2), and many naturally environments have low iron bioavailability because of its low solubility form under neutral aerobic conditions (10^{-9} to 10^{-10} M) (3, 4). Secondly, vertebrates use nutrient sequestration to defend against bacterial colonization in a strategy termed nutritional immunity (5–7).

Microorganisms have acquired strategies for acclimation to low iron bioavailability. The most basic mechanisms include (i) iron storage when it is available in ferritin or bacterioferritin for use when iron is scarce (8) and (ii) retrenchment until the iron scarcity is relieved (9). Bacteria also utilize high-affinity siderophores-based iron capture methods. These small iron-binding molecules are secreted in the medium. The complex iron-siderophore is then transported back into the microorganism's interior through high-affinity membrane transporters, where it is transferred to iron-trafficking proteins (10, 11). Siderophores are nonribosomal peptides (NRP) or polyketide (PK)-NRP hybrids (12). A prerequisite for the synthesis of all NRPs, PKs, and PK-NRP hybrids is the posttranslational attachment of P-Pant arms from coenzyme A (CoA) to a conserved serine residue of a carrier protein, converting inactive apo-synthases to active holo-synthases. This reaction is catalysed by members of the type II family of phosphopantetheinyl transferases (PPTases) (13). The PPTase known to be involved in the

biosynthesis of siderophores enterobactin, salmochelin and yersiniabactin, and encoded by the core genome of *E. coli*, is EntD.

Some diverse pathogenic enterobacteria, including approximately 50% of the *E. coli* strains belonging to the phylogenetic group B2, are able to synthesize the PK-NRP hybrid colibactin. Colibactin is a genotoxin that induces DNA double-strand breaks, senescence and chromosomal abnormalities in eukaryotic cells (14–16) and was demonstrated to be a virulence factor in a mouse model sepsis (17) and in a rat model of neonatal meningitis (18). The PPTase involved in colibactin biosynthesis is called ClbA, and is encoded on the gene cluster allowing colibactin synthesis, the *pks* island. We have recently highlighted the existence of a cross-talk between colibactin and siderophores synthesis, as ClbA can also contribute to siderophores biosynthesis (19).

We have also recently shown that the expression of *clbA* is regulated by iron bioavailability, leading to a modulation of colibactin biosynthesis (20). High iron supply inhibits *clbA* transcription whereas iron scarcity induces a longer maintenance of *clbA* transcription. Whereas the production of colibactin in high iron supply is inhibited (Tronnet *et al.*, submitted), biosynthesis of colibactin during iron scarcity was unknown.

Here, we addressed the question of the regulation of colibactin synthesis under iron scarcity. We demonstrate that colibactin production is decreased under low iron bioavailability and this phenomenon is associated with a higher production of siderophores, through ClbA. This preliminary work provides insights into the mechanism of adaptation of colibactin-producing *E. coli* and highlights the complex network of regulation involving colibactin, siderophores and iron through ClbA.

Results

Iron scarcity induces a decrease of the genotoxicity associated with the colibactin production

We recently showed that the transcription of *clbA* was induced in iron scarcity conditions (20). Here, we assessed the impact of iron scarcity on the production of the colibactin. The production of genotoxin colibactin was measured in wild type (WT) strain M1/5 through bacteria-host cell interaction and subsequent quantification of megalocytosis (Fig. 1A) and histone H2AX phosphorylation (Fig. 1B) which both correlate with DNA double strand breaks

resulting from the genotoxic effect of colibactin (14). This revealed that the supplementation of the interaction medium (DMEM-Hepes) with 40 μ M of 8-Hydroxyquinoline, an iron chelator, decreased significantly the genotoxic effect induced by colibactin (Fig. 1A, 1B).

The mature colibactin has not been fully characterized yet. However, a biosynthesis by-product derived from the colibactin assembly line, *i.e.* the N-myristoyl-D-asparagine moiety, has been recently characterized (21–23). This moiety is a prodrug motif that is cleaved during the late activation step (24). We developed a LC-MS assay to quantitatively measure the amount of N-myristoyl-D-asparagine as a means to indirectly quantify the production of the genotoxin (25) by *E. coli* M1/5 (Figure 1C). The results showed that in low iron conditions, the quantity of colibactin prodrug motif was decreased in the bacterial culture supernatant compared to the DMEM-Hepes (Figure 1C). Altogether, these data showed that iron scarcity decreased the synthesis of colibactin in a wild type strain.

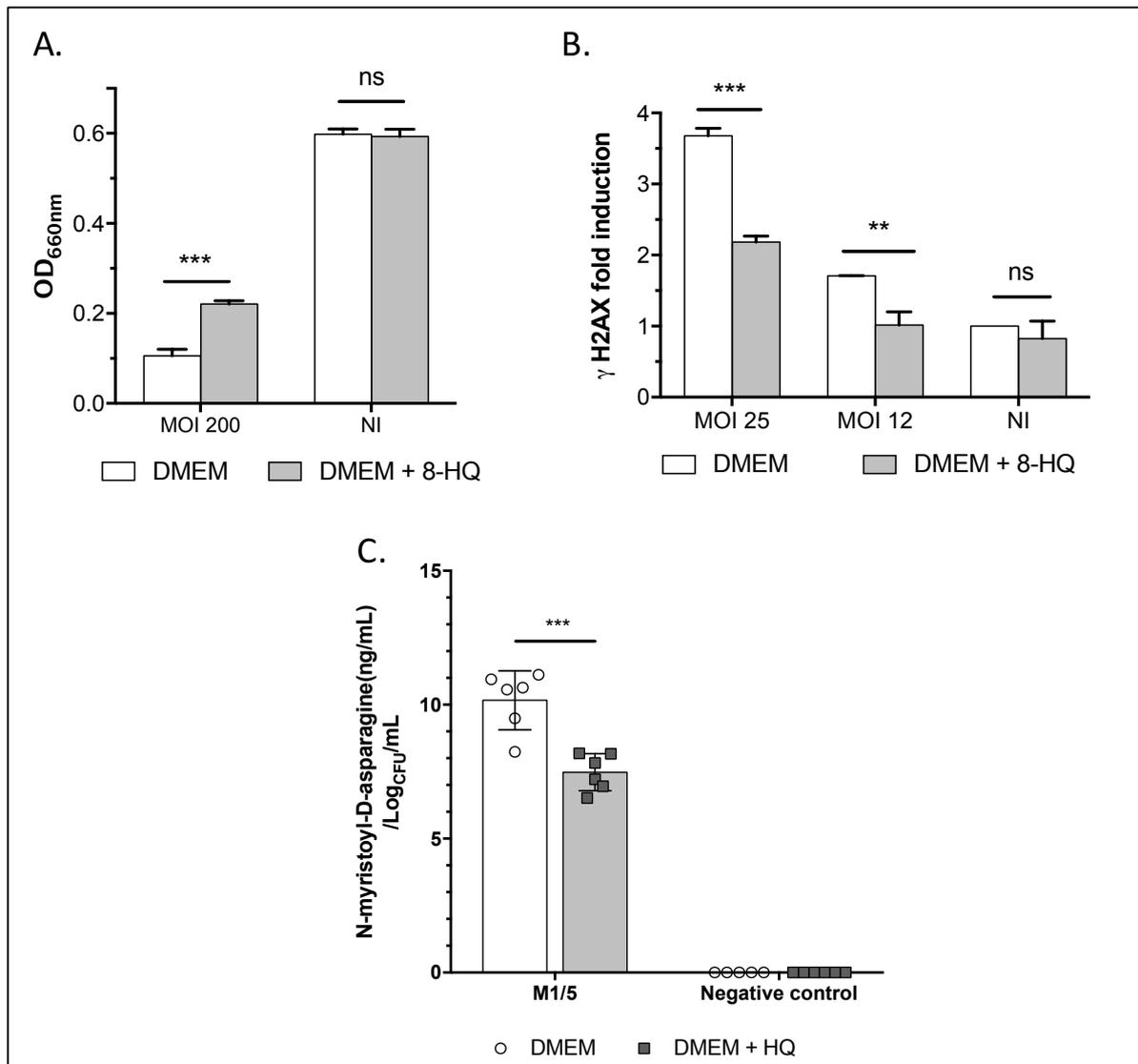


Figure 1. Production of colibactin genotoxin is decreased in iron scarcity conditions. A. The production of colibactin by *E. coli* strain M1/5 was determined by quantification of megalocytosis as previously described (14). HeLa cells were infected with *E. coli*, in DMEM-Hepes supplemented with 100 μ M FeCl₃ or not, then washed 4h post infection. After infection, the cells were incubated for 72h with gentamicin before protein staining with methylene blue. The staining was quantified by acid-extraction of the methylene blue and measurement of optical density at 660nm (OD_{660nm}). Multiplicity of infection (number of bacteria per cells): MOI = 200. B. The production of colibactin by *E. coli* strain M1/5 was determined by quantification of H2AX phosphorylation. HeLa cells were infected with *E. coli*, in DMEM-Hepes supplemented with 100 μ M FeCl₃ or not, then washed 4h post infection. The cells were then incubated 3h in DMEM medium supplemented with gentamicin before fixation, then permeabilized and labelled for DNA and phosphorylated H2AX histone (γ -H2AX) using an In-

Cell Western method (19). MOI = 25 and 12. C. The colibactin prodrug motif N-myristoyl-D-asparagine produced by *E. coli* strain M1/5 was quantified by LC-MS. Bacteria were cultivated at 37°C for 18h in DMEM-Hepes or DMEM-Hepes supplemented with 8-HQ (40µM), and N-myristoyl-D-asparagine was quantified in culture supernatants by LC-MS using N-myristoyl-L-asparagine (isomer of the N-myristoyl-D-asparagine colibactin prodrug motif) as a standard. The results were normalized to the bacterial biomass and are presented as quantity of N-myristoyl-D-asparagine (ng/ml). Data represented in the graph were obtained from three biological replicates and two independent experiments. NI: not infected. Statistical analysis: two-way anova. ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$. ns: not significant.

Iron scarcity induces increased biosynthesis of siderophores through ClbA.

We have recently highlighted the existence of cross talk between colibactin and siderophore biosynthesis (19). Indeed, ClbA can replace EntD and contributes to siderophores biosynthesis. Here, we assessed the impact of iron scarcity on the production of siderophores via ClbA. The production of siderophores was measured in wild type (WT) strain M1/5, and its two isogenic derivatives, mutated for *entD* or *clbA*. The quantification of the total siderophores produced revealed that the supplementation of the DMEM-Hepes with 40µM of 8-Hydroxyquinoline, , increased significantly the siderophores produced (Fig. 2A). This was observed in the WT strain and its two derivatives. Because M1/5 is able to synthesize a PPTase-independent siderophore, i.e. aerobactin, we reproduced this experiment in a K-12 *E. coli* strain, MG1655. which only produces enterobactin. The results confirmed that iron scarcity induced an increased biosynthesis of enterobactin, through ClbA.

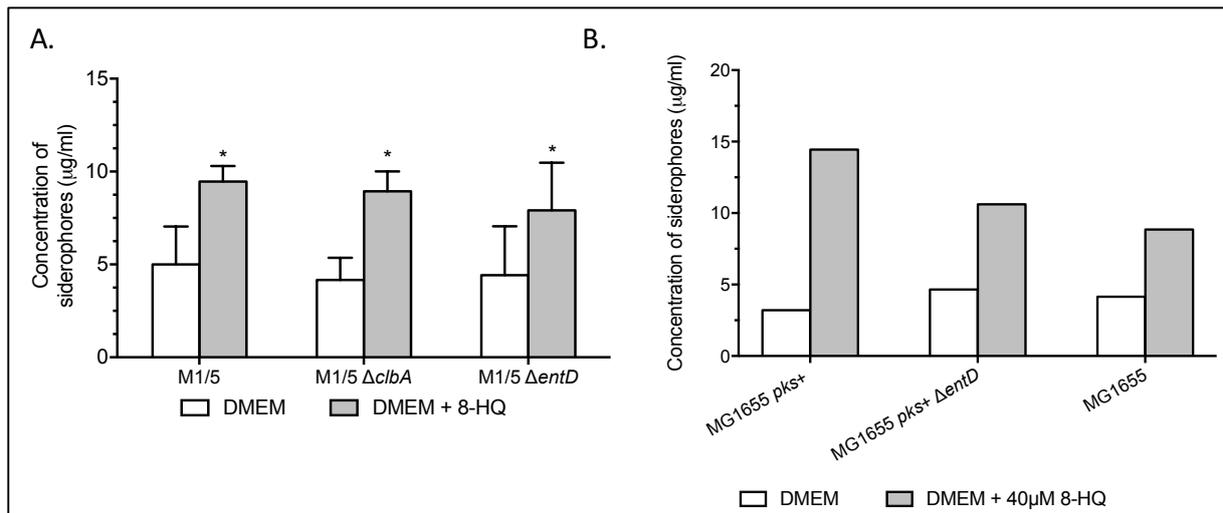


Figure 2. Iron scarcity induces an increased production of siderophores through *ClbA*. Quantification of total siderophores was assessed in M1/5 and its derivatives (A) and MG1655 and MG1655 in which the *pkS* island (B), allowing colibactin production, was inserted.

Material and Methods

Bacterial strains, mutagenesis and growth conditions

Bacterial strains used in this study are listed in Table 1. For genetic manipulations, *E. coli* strains were routinely grown at 37°C under shaking in 3ml of Lennox L broth (LB, Invitrogen). Kanamycin (50 µg/ml) or chloramphenicol (25 µg/ml) were added to the medium when required. Inactivation of *E. coli* genes was undertaken using phage λ Red recombinase (26). The primers used to construct mutants are shown in Table 1. Allelic exchanges were confirmed by PCR. For megalocytosis assay, genotoxicity assay and N-myristoyl-D-asparagine quantification, *E. coli* strains were grown overnight in DMEM containing Hepes (DMEM-Hepes, Gibco, 0.034 µM Fe) at 37°C with shaking. The overnight cultures were then diluted 1:50 in DMEM-Hepes supplemented or not with 40 µM of 8-Hydroxyquinoline and grown until $OD_{600nm} = 0.6$.

Table 1: Strains used in this study

<i>E. coli</i> strain	Genotype or phenotype	Antibiotic resistance

Résultats expérimentaux

M1/5	Colibactin, enterobactin, yersiniabactin, aerobactin producer	Strep ^R
M1/5ΔclbA	<i>clbA</i> mutant of M1/5, inactivated for colibactin production	Strep ^R , Kan ^R
M1/5ΔentD	<i>entD</i> mutant of M1/5	Strep ^R , Kan ^R
MG1555	Enterobactin producer	Strep ^R
MG1655 pks+	MG1655 carrying BAC <i>pks</i> ⁺ , enterobactin and colibactin producer	Cm ^R
MG1655 pks+ΔentD	<i>entD</i> mutant of MG1655 carrying BAC <i>pks</i> ⁺	Cm ^R , Kan ^R

N-myristoyl-D-asparagine quantification by liquid chromatography/mass spectrometry

Quantification of colibactin prodrug motif was performed as previously described (25). Briefly, *E. coli* strain M1/5 was grown in DMEM-Hepes with or without 8-HQ at 37°C for 4h, after a 1:50 sub-culture until OD_{600nm} = 0.6. Supernatants of cultures were obtained by centrifugation and filtered. Quantification experiments were conducted with ultra-performance liquid chromatography-high resolution/heated electrospray ionization mass spectrometry (UPLC-HR/HESI-MS). The data were recorded on a Thermo Scientific Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer coupled to a Dionex Ultimate 3000 UPLC. The MS was operated in positive ionization mode at a scan range of 200-500 m/z and a resolution of 35,000. The spray voltage was set to 3.5 kV, the S-lens to 35, the auxiliary gas heater temperature to 438°C and the capillary temperature to 270°C. Absolute quantification was achieved by using a Schotten-Baumann reaction-derived N-myristoyl-L-asparagine (isomer of the N-myristoyl-D-asparagine colibactin cleavage product) as a standard. Data were obtained from undiluted cell free sample supernatants, concentrations were calculated using Thermo Xcalibur 2.2 Quan Browser.

Megalocytosis assay

Colibactin induces megalocytosis in cultured eukaryotic cells, manifest as progressive enlargement of the cell body and nucleus and the absence of mitosis. We quantified the extent of colibactin-induced megalocytosis using a methylene blue binding assay (14). *E. coli* strains were added to HeLa cells at multiplicities of infection (MOIs) of 200, co-cultured for 4h and washed. Cells were then incubated for 72h with cell culture medium containing 200 µg/mL gentamicin followed by staining with methylene blue. Dye binding was determined spectrophotometrically at OD_{660nm}.

Genotoxicity assay

The capacity of colibactin to engender double strand DNA breaks was determined in HeLa cells by γ -H2AX immunofluorescence analysis (19); this assay monitors the phosphorylation of histone H2AX, a sensitive marker of double strand DNA breaks. HeLa cells (1.5×10^4 cells in 200 μ l Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% foetal calf serum, 80 μ g/ml gentamicin and 0.1 unit/ml bovine insulin) were dispensed into 96-well cell culture plates. After incubation at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 24h, the cells were washed and incubated with bacteria at MOI = 25 or 12 bacteria per cell. After 4h infection at 37°C in 5% CO₂, cells were washed 3 times with Hank's Balanced Salts Solution and incubated at 37°C in cell culture medium for 3h with 200 μ g/ml gentamicin. Cells were fixed in the plate with 4% paraformaldehyde and processed as previously described (19). Rabbit monoclonal anti- γ -H2AX antibody #9718 (Cell Signaling Technology Inc, Danvers MA) was diluted 1:500 in blocking solution and incubated for 2h at room temperature. IRDyeTM 800CW-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody was diluted 1:100 in blocking solution and incubated for 1 h. RedDot2 (Biotium) was used for DNA labelling. DNA and γ -H2AX were visualized using an Odyssey Infrared Imaging Scanner (Li-Cor ScienceTec, Les Ulis, France) using 680nm and 800nm channels for RedDot2 and IRDyeTM800 respectively. Relative fluorescence units for γ -H2AX per cell (as determined by γ -H2AX divided by DNA content) were divided by vehicle controls to determine percentage change in phosphorylation of H2AX levels relative to control. All experiments were carried out in triplicate.

Quantitative siderophore assay

The siderophore concentration in DMEM-Hepes supplemented or not with 8-HQ synthesized by *E. coli* strains was determined using the SideroTec assay (Emergen Bio, Maynooth, Ireland).

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 6.0. The mean with standard error of the mean (SEM) is shown in figures, and P-values were calculated using two-way ANOVA followed by a Bonferroni post-test unless otherwise stated. A P-value of less than 0.05 was considered statistically significant and is denoted by *. P<0.01 is denoted by ** and P<0.001 by ***, ns: not significant.

Discussion

Nous avons récemment démontré qu'une carence en fer induisait une induction plus forte de la transcription de *clbA* que dans la condition témoin (20).

Les résultats préliminaires obtenus dans cette étude inachevée montrent que dans ces conditions, l'induction plus forte de *clbA* est associée à une diminution de la biosynthèse de la colibactine. Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats. D'abord, il semblerait que seule la transcription de *clbA* soit impactée par une carence en fer (20). Cependant, la transcription de tous les gènes de l'îlot *pks*, permettant l'assemblage de la colibactine, n'a pas été testée, et l'on pourrait supposer que l'un d'entre eux soit négativement régulé par des conditions de carence en fer. Ceci aboutirait, malgré une plus forte expression de *clbA*, à une répression de la synthèse de la colibactine. La seconde hypothèse serait que la nécessité, pour la survie de la bactérie, d'acquérir du fer (via les sidérophores notamment) dans ces conditions prime sur la biosynthèse de la colibactine. Dans ce cas-là, la bactérie s'assure de pouvoir produire suffisamment de sidérophores en mettant à disposition les enzymes essentielles à leur biosynthèse. Le fait que l'on observe une diminution de la quantité du produit de clivage lorsqu'il y a peu de fer biodisponible, montre que c'est la régulation ou la biosynthèse de la colibactine qui sont impactés, et non pas son activité génotoxique, ou son export hors de la bactérie.

Afin de tester ces hypothèses, nous avons dosé les sidérophores totaux produits par la bactérie dans les conditions de carence en fer., les résultats montrent que dans ces conditions, ClbA permet une production accrue de sidérophores. Ce résultat est en faveur de la seconde hypothèse, dans laquelle ClbA pourrait être redirigée vers la synthèse des sidérophores. Cette hypothèse n'exclut pas pour autant la seconde, et une combinaison des deux pourrait également exister.

Le mécanisme de régulation qui entraîne une potentielle redirection de ClbA vers la biosynthèse des sidérophores, au détriment de celle de la colibactine n'est pas encore élucidé, et nécessitera des investigations complémentaires.

Si cette étude n'est pour le moment que préliminaire, elle met en lumière l'importance de la connexion qui existe entre les sidérophores et la colibactine via ClbA. Cette interconnexion entre ces voies de biosynthèse et le caractère pléiotrope de ClbA pourrait apporter un

avantage adaptatif pour la souche qui les produit, et il est donc essentiel d'en comprendre le mécanisme.

References

1. **Archibald F.** 1983. *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *FEMS Microbiol Lett* **19**:29–32.
2. **Posey JE, Gherardini FC.** 2000. Lack of a Role for Iron in the Lyme Disease Pathogen. *Science* **288**:1651–1653.
3. **Cornelis P, Wei Q, Andrews SC, Vinckx T.** 2011. Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Met Integr Biometal Sci* **3**:540–549.
4. **Andrews S, Norton I, Salunkhe AS, Goodluck H, Aly WSM, Mourad-Agha H, Cornelis P.** 2013. Control of iron metabolism in bacteria. *Met Ions Life Sci* **12**:203–239.
5. **Weinberg ED.** 1975. Nutritional immunity. Host's attempt to withhold iron from microbial invaders. *JAMA* **231**:39–41.
6. **Schaible UE, Kaufmann SHE.** 2004. Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol* **2**:946–953.
7. **Hood MI, Skaar EP.** 2012. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface. *Nat Rev Microbiol* **10**:525–537.
8. **Andrews SC.** 1998. Iron storage in bacteria. *Adv Microb Physiol* **40**:281–351.
9. **Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quiñones F.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**:215–237.
10. **Braun V, Braun M.** 2002. Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **529**:78–85.
11. **Saha R, Saha N, Donofrio RS, Bestervelt LL.** 2013. Microbial siderophores: a mini review. *J Basic Microbiol* **53**:303–317.
12. **Walsh CT.** 2008. The Chemical Versatility of Natural-Product Assembly Lines. *Acc Chem Res* **41**:4–10.
13. **Beld J, Sonnenschein EC, Vickery CR, Noel JP, Burkart MD.** 2013. The phosphopantetheinyl transferases: catalysis of a post-translational modification crucial for life. *Nat Prod Rep* **31**:61–108.
14. **Nougayrède J-P, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, Buchrieser C, Hacker J, Dobrindt U, Oswald E.** 2006. *Escherichia coli* Induces DNA Double-Strand Breaks in Eukaryotic Cells. *Science* **313**:848–851.
15. **Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrède J-P.** 2010. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* **107**:11537–11542.
16. **Payros D, Secher T, Boury M, Brehin C, Ménard S, Salvador-Cartier C, Cuevas-Ramos G, Watrin C, Marcq I, Nougayrède J-P, Dubois D, Bedu A, Garnier F, Clermont O, Denamur E,**

- Plaisancié P, Theodorou V, Fioramonti J, Olier M, Oswald E.** 2014. Maternally acquired genotoxic *Escherichia coli* alters offspring's intestinal homeostasis. *Gut Microbes* **5**:313–512.
17. **Marcq I, Martin P, Payros D, Cuevas-Ramos G, Boury M, Watrin C, Nougayrède J-P, Olier M, Oswald E.** 2014. The Genotoxin Colibactin Exacerbates Lymphopenia and Decreases Survival Rate in Mice Infected With Septicemic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **210**:285–294.
18. **McCarthy AJ, Martin P, Cloup E, Stabler RA, Oswald E, Taylor PW.** 2015. The Genotoxin Colibactin Is a Determinant of Virulence in *Escherichia coli* K1 Experimental Neonatal Systemic Infection. *Infect Immun* **83**:3704–3711.
19. **Martin P, Marcq I, Magistro G, Penary M, Garcie C, Payros D, Boury M, Olier M, Nougayrède J-P, Audebert M, Chalut C, Schubert S, Oswald E.** 2013. Interplay between Siderophores and Colibactin Genotoxin Biosynthetic Pathways in *Escherichia coli*. *PLoS Pathog* **9**.
20. **Tronnet S, Garcie C, Rehm N, Dobrindt U, Oswald E, Martin P.** 2016. Iron homeostasis regulates the genotoxicity of *Escherichia coli* producing colibactin. *Infect Immun*.
21. **Bian X, Fu J, Plaza A, Herrmann J, Pistorius D, Stewart AF, Zhang Y, Müller R.** 2013. In Vivo Evidence for a Prodrug Activation Mechanism during Colibactin Maturation. *ChemBioChem* **14**:1194–1197.
22. **Brotherton CA, Balskus EP.** 2013. A Prodrug Resistance Mechanism Is Involved in Colibactin Biosynthesis and Cytotoxicity. *J Am Chem Soc* **135**:3359–3362.
23. **Vizcaino MI, Crawford JM.** 2015. The colibactin warhead crosslinks DNA. *Nat Chem* **7**:411–417.
24. **Dubois D, Baron O, Cougnoux A, Delmas J, Pradel N, Boury M, Bouchon B, Bringer M-A, Nougayrède J-P, Oswald E, Bonnet R.** 2011. ClbP Is a Prototype of a Peptidase Subgroup Involved in Biosynthesis of Nonribosomal Peptides. *J Biol Chem* **286**:35562–35570.
25. **Garcie C, Tronnet S, Garénaux A, McCarthy AJ, Brachmann AO, Pénary M, Houle S, Nougayrède J-P, Piel J, Taylor PW, Dozois CM, Genevaux P, Oswald E, Martin P.** 2016. The Bacterial Stress-Responsive Hsp90 Chaperone (HtpG) Is Required for the Production of the Genotoxin Colibactin and the Siderophore Yersiniabactin in *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **214**:916–924.
26. **Datsenko KA, Wanner BL.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6640–6645.

CHAPITRE IV : LA GÉNOTOXINE COLIBACTINE JOUE UN RÔLE DANS LA COLONISATION DE L'INTESTIN

Récemment, plusieurs études ont montré que la colibactine, produite par environ 50% des *E. coli* du groupe B2, était un facteur de virulence dans des modèles rongeurs de méningite néonatale et de septicémie [227,228]. Cependant, la niche primaire de *E. coli* est l'intestin, qu'elle colonise dès les premières heures après la naissance et où elle persiste tout au long de la vie. Une seule étude épidémiologique indique le rôle putatif de la colibactine dans l'implantation de *E. coli* dans le tube digestif [316].

Dans ce travail, nous avons voulu élucider le rôle de la colibactine dans la capacité de colonisation du tractus intestinal par *E. coli*, grâce à l'utilisation d'un modèle de colonisation naturelle verticale développé au laboratoire [224]. Les résultats, encore préliminaires, suggèrent que la colibactine joue un rôle dans la colonisation de l'intestin par les *E. coli*.

Ils sont présentés sous forme d'une ébauche de manuscrit, intitulé « The genotoxin colibactin plays a role in the gut colonization »

The genotoxin colibactin plays a role in the gut colonization

Sophie Tronnet^{1,2}, Cecile Gaudru^{1,2,3}, Christophe Garcia^{1,2,3}, Marcy Belloy¹, Éric Oswald^{1,2,3}, Patricia Martin^{1,2,3}

¹ IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRA, ENVT, Toulouse, France

² Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France

³ CHU Toulouse, Service de Bactériologie-Hygiène, Toulouse, France

Introduction

The intestinal microbiota plays a major role in the development of digestive, metabolic, immune and neurologic functions of the host. The initial microbial load of new-born originates from the nearby environment and from the intestinal and vaginal microbiota of the mother (1, 2), and then evolves toward a complex consortium throughout host development and environmental exposures. *Escherichia coli* is a common bacterium of the intestinal commensal microflora of human and warm-blooded animals, colonizing the digestive tract within hours or days after birth, dominating the microbiota. Then *E. coli* becomes the predominant facultative anaerobic bacteria within the mature gut microbiota, establishing a stable lifelong interaction with the host. Phylogenetic analysis revealed that *E. coli* can be classified into 7 major phylogenetic groups (3). The B2 group contains the highest number of strains responsible for chronic (cancers, Crohn's disease, ...) or extra-intestinal infections (neonatal meningitis, septicemia, urinary tract infections, ...). epidemiologic studies over the past 30 years demonstrated that the prevalence of these strains increases in the fecal microbiota of populations living in industrialized countries, to the detriment of the ancestral A group (4–7). Factors involved in this evolution remain unknown, even if dietary habits, increased of level of hygiene, use of antibiotics could presumably be involved in this major modification in the phylogenetic group distribution of fecal *E. coli* population.

About 50% of the B2 group strains synthesize a genotoxin named colibactin, a polyketide nonribosomal peptide hybrid compound (Nougayrède *et al.*, 2006;). This secondary metabolite is produced by the pathogenicity *pks* island, that encodes for nonribosomal peptide synthases (NRPS), polyketide synthases (PKS), hybrids PKS-NRPS, additional maturation proteins and an efflux pump. In the cytoplasm, colibactin is synthesized as an inactive prodrug called precolibactin, exported into the periplasm by the efflux pump encoded on the *pks* island. Once in the periplasm, the prodrug motif of precolibactin is hydrolyzed to release the active genotoxin colibactin. This action is achieved by the periplasmic-bound ClbP protein (8–10). Colibactin induces DNA double strand breaks senescence and chromosomal abnormalities in eukaryotic cells (11–14) and was demonstrated to be a *bona fide* virulence factor in a mouse model of sepsis and in a rat model of neonatal meningitis (12, 12–16). However, the role of colibactin in the intestinal colonization *E. coli* was unknown. Only one epidemiologic study associated the *pks* island with a better colonization capacity, in healthy infants followed over the first 18 months of life (17).

Here, we studied the role of colibactin in a mouse model of natural vertical colonization that mimics the natural transmission of *E. coli* from mothers to newborns. We tested the colonization capacity of a colibactin producing *E. coli* mutated or not for the *clbP* gene. We evidenced that colibactin plays an important role in the establishment of intestinal colonization by genotoxic *E. coli*, both in individual colonization and in competition with other *E. coli* strains. Consequently, we hypothesized that among the factors leading to the increased prevalence of B2 group *E. coli*, colibactin could be a major element.

Material and methods

Bacterial strains, mutagenesis procedures and growth conditions.

Bacterial strains used in this study are listed in the Table 1. The *E. coli* strain SP15 was isolated from a neonatal meningitis. For genetic manipulations, *E. coli* strains were routinely grown at 37°C under 240 r.p.m. shaking in 3mL of Lennox L broth (LB, Invitrogen). Streptomycin (50 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml), or chloramphenicol (25µg/ml) were added to the medium when required.

The *clbP* gene inactivation was performed using the lambda Red recombinase method (18)

using primers PM_clbP_P1 (5'-TTCCGCTATGTGCGCTTTGGCGCAAGAACA TGAGCCTATCGGGGCGCAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3') and PM_clbP_P2 (5'-GTATACCCGGTGCGACATAGAGCATGGCGGCCACGAGCCCAGGAACCGCCCATATGAATATCCTCCT TAG-3'). The mutation of the gene was verified by PCR using primers IHAPJPN29 and IHAPJPN30 (19). Before oral administrations, all *E. coli* strains were grown overnight in LB broth supplemented with the appropriate antibiotics, then these cultures were diluted 1 :50 in LB broth without antibiotics until OD_{600nm}=0.6. Bacterial pellets from overnight cultures were washed in sterile PBS, and resuspended in sterile PBS to the concentration of 10⁹ colony forming units (CFU)/50μL.

Table 1: Strains used in this study

<i>E. coli</i> strain	Genotype or phenotype	Antibiotic resistance
SP15	Colibactin producer, phylogenetic group B2 strain	Strep ^R , Cm ^R
SP15Δ <i>clbP</i>	<i>clbP</i> mutant of SP15, inactivated for colibactin production	Strep ^R , Cm ^R , Kan ^R
MG1655	Phylogenetic group A strain	Strep ^R

Experimental animal model of bacterial colonization

This model was based on a rat model of vertical colonization developed in our lab (14). Briefly, pregnant Specific-Pathogen-Free (SPF) SWISS female mice were obtained from Janvier on gestational day 15. Pregnant mice were housed separately under specific-pathogen-free (SPF) conditions and had access to food and drinking water supplemented with streptomycin sulfate (5g/L) (Fig. 1). Streptomycin sulfate selectivity eliminates the resident facultative with little disruption of the anaerobe community, opening a niche for the introduced *E. coli* strains (14, 20). Pregnant females were inoculated with 10⁹ in 50μL bacteria by gavage one day before delivery. Streptomycin treatment was stopped just after the delivery. Bacterial colonization was monitored in the pups from 8 days after birth (D8) to 28 days after birth (D28). The weaning of the pups was performed 21 days after birth. Fecal bacterial load in the mothers was also followed until the weaning.

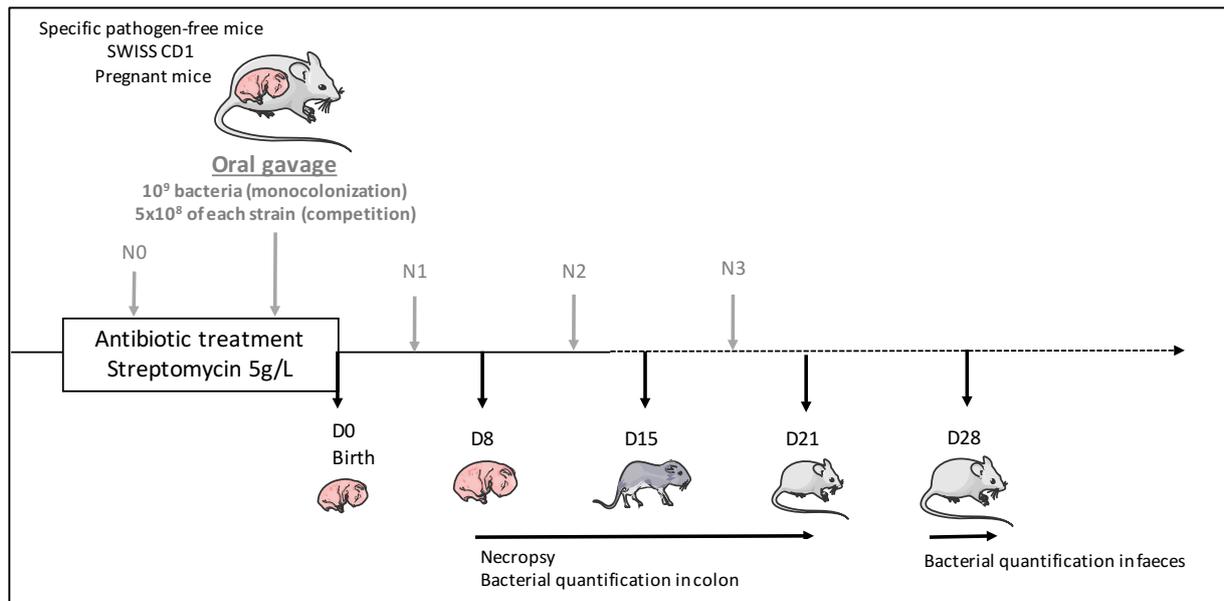


Figure 1: Experimental design of mouse model mimicking colonization of the gut with maternally transmitted *E. coli*. Pregnant mice received an antibiotic treatment (streptomycin, 5g/L) in drinking water and were orally inoculated the day before delivery with 10⁹ CFU of bacteria. Newborns were sacrificed at Day 8 (D8), D15 and D21 after birth and the colons were collected. At D28, feces were collected. Fecal bacterial load of the mothers was also followed (N0, N1, N2, N3) until the weaning of the newborns (D21).

Colonic bacterial load

At D8, D15 and D21, colon homogenates were prepared in 1mL of sterile PBS using Precellys tissue homogenizer. At D28, feces homogenates were prepared. 10-fold serial dilutions of homogenates were plated on MacConkey agar plates supplemented with the appropriate antibiotics. The limit of detection was 10² CFU/ml. To distinguish strains SP15 and MG1655, 20 colonies were tooth-picked from MacConkey agar plates containing streptomycin to MacConkey agar plates containing streptomycin and chloramphenicol.

Statistical analysis

Statistical evaluation of differences between groups was determined by using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni post-test with GraphPad Prism 6. All data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). Value <0.05 was considered significant.

Results

Colibactin is not required for the initial implantation of *E. coli* in the gut but is necessary for *E. coli* to be maintained at later stage, in a model of monocolonization

To investigate the role of colibactin in the establishment of *E. coli* in the gut, we monitored the mono-colonization of pups' gut by three strains of *E. coli*: the B2 group *E. coli* strain SP15, its isogenic *clbP* mutant and the A group *E. coli* strain MG1655 (Fig. 2).

Our results showed that MG1655 did not colonize efficiently the intestine, as we were unable to detect this A group *E. coli* at all time points. In contrast, both the WT and the mutant strain from the B2 group colonized the newborns guts at a high level at all time points. (Fig. 2). Interestingly, 8 and 15 days after birth, SP15 and its derivative were equally detected. However, at (D21), we observed a significant reduction of the SP15 Δ *clbP* strain, whereas the WT strain SP15 stayed stable in the intestine. In conclusion, we showed in our model that the B2 group *E. coli* has a better capacity to colonize the intestine compared to A group *E. coli*. In addition, our results showed that in early stage of colonization of the gut, colibactin did not seem essential for implantation of the bacteria, but played a role in the intestinal maintenance in the later stage of colonization.

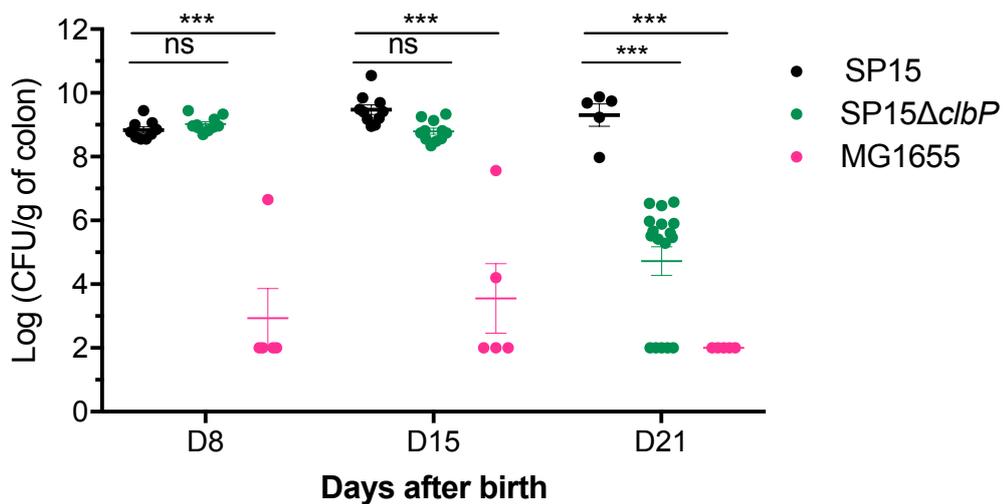


Figure 2 : Colibactin plays a delayed role in the colonization of the gut by genotoxic *E. coli*.

Evaluation of gut colonization in colon homogenates of neonates 8, 15 and 21 days after their birth. Pregnant mice were orally inoculated with strains SP15, SP15 Δ *clbP* or MG1655

(monocolonization). At least 5 pups were sacrificed at each time point. ***, $P < 0.001$, ns, not significant.

The B2 group *E. coli* strain out-competes the A group *E. coli* strain.

To further investigate the impact of colibactin on intestinal colonization, we performed competition experiments. pregnant mice were inoculated with strains SP15 and MG1655 at a 1:1 ratio. Quantification of pups' colonization showed that strain MG1655 was not detectable at all time point, contrary to strain SP15 that colonized efficiently the offspring's gut, (Fig. 3A) up to D80 (data not shown). In conclusion, SP15 out-competes MG1655 for neonates gut colonization.

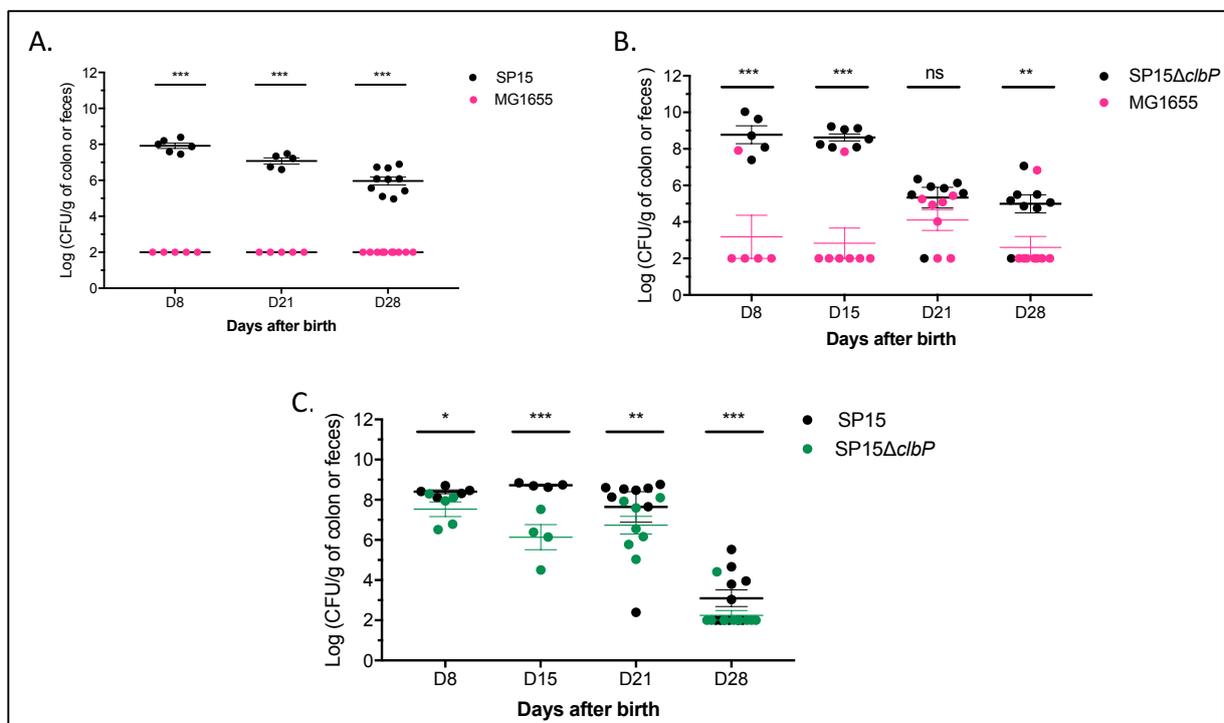


Figure 3: The mutation of *clbP* in a colibactin producing *E. coli* alters its competitive capacity in the intestine. Pregnant mice were fed SP15 and MG1655 (A), SP15 Δ *clbP* and MG1655 (B) or SP15 and SP15 Δ *clbP* (C). At least 5 pups were sacrificed at each point. ***, $P < 0.001$, **, $P < 0.01$, *, ns, not significant.

Colibactin is not required for the initial implantation of *E. coli* in the gut but is necessary for *E. coli* to be maintained at later stage, in a model of competition

In order to investigate the role of colibactin in the establishment of genotoxic B2 *E. coli* in the gut in competition, the strain SP15 Δ *clbP* was orally inoculated together with the A group *E.*

coli, strain MG1655 (Fig 2B). This revealed that at D8 and D15 the pups were almost exclusively colonized by strain SP15 Δ *clbP*. On the contrary, at D21 most of the pups carried both strains SP15 Δ *clbP* and MG1655. At D28, strain MG1655 was again outcompeted by strain SP15 Δ *clbP*. These data suggest that the synthesis of colibactin constitutes a fitness advantage for colonization, especially at D21.

We then force-fed pregnant mice in the same model of colonization with SP15 WT and its isogenic *clbP* mutant. This revealed that at D8 the pups were colonized by both WT and mutant strain. On the contrary, from D15 most of the pups carried quantitatively more WT strain than mutant SP15 Δ *clbP*. This result confirmed that colibactin played a role in the intestinal colonization, and confers an adaptive advantage for gut colonization.

Discussion

Cette étude, bien qu'inachevée, nous a permis de déterminer de façon expérimentale que la souche du groupe B2 a une capacité à coloniser l'intestin plus importante qu'une souche du groupe A. Par ailleurs, nous avons montré que si la colibactine ne semble pas jouer de rôle lors de la colonisation précoce (D8) du tractus digestif par *E. coli*, elle joue un rôle crucial dans le maintien de la souche qui la produit dans le tractus gastro-intestinal, que ce soit en monocolonisation ou en compétition. Ainsi, aux temps tardifs, la production de la colibactine semble être un avantage pour se maintenir dans l'intestin. C'est-à-dire une fois que la souche est probablement implantée dans une niche complexe de l'intestin et doit déployer des capacités de colonisation importantes pour y rester. Par ailleurs, à partir d'une quinzaine de jours après la naissance, les souriceaux passent progressivement d'une alimentation lactée maternelle à une alimentation granulée identique à celle de la mère. Ce changement alimentaire provoque certainement une modification de la microflore intestinale des souriceaux, et c'est à ce moment-là que la colibactine semble jouer un rôle. Par ailleurs, le fait que la mutation du gène *clbP* n'altère pas totalement la capacité de la souche mutée à coloniser montre que d'autres facteurs interviennent dans ce mécanisme, et que c'est finalement un ensemble complexe d'éléments qui favorisent la capacité de ces souches à coloniser l'intestin. Plusieurs études montrent d'ailleurs que ces souches regroupent un ensemble de facteurs (motilité, production de sidérophores, ...) favorisant leur aptitude à coloniser la niche commensale (5, 21, 22).

Nos résultats montrent aussi que la souche du groupe A MG1655 colonise le tube digestif de façon plus efficace en présence de la souche SP15 mutée pour *clbP* que lorsqu'elle est seule dans l'intestin. Cela pourrait suggérer que les deux souches colonisent la même niche, et que la souche du groupe B2, qui ne produit plus la colibactine dû à la mutation de *clbP*, permet le maintien de celle du groupe A, ce qui n'est pas le cas lorsque la souche SP15 est sauvage. En effet, nos résultats montrent que lorsque la souche du groupe phylogénétique B2 est présente dans l'intestin, la souche du groupe phylogénétique A n'est pas capable de le coloniser. Une étude épidémiologique, en accord avec nos résultats, portant sur la prévalence des groupes phylogénétiques de *E. coli* dans des échantillons de selles de 100 personnes saines, a montré que la présence du phylogroupe B2 était souvent associée à une absence des autres groupes phylogénétiques (23). La souche sauvage du groupe phylogénétique B2 pourrait avoir un effet antibiotique sur celle du groupe phylogénétique A. Une étude récente montre d'ailleurs que la colibactine a un effet antibiotique sur *Staphylococcus aureus* (24).

En conclusion, ces résultats ont permis de mettre en évidence pour la première fois un rôle de la colibactine dans le maintien des souches dans un microbiote complexe. Cependant, les raisons pour lesquelles la colibactine constitue un avantage dans la colonisation du tractus digestif ne sont pas claires. Cette étude montre néanmoins que la colibactine pourrait être l'une des causes de l'émergence du groupe phylogénétique B2 dans les pays développés.

References

1. **Biasucci G, Benenati B, Morelli L, Bessi E, Boehm G.** 2008. Cesarean Delivery May Affect the Early Biodiversity of Intestinal Bacteria. *J Nutr* **138**:1796S–1800S.
2. **Hurre A, Kalliomäki M, Rautava S, Rinne M, Salminen S, Isolauri E.** 2008. Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology* **93**:236–240.
3. **Jaureguy F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, Carbonnelle E, Lortholary O, Clermont O, Denamur E, Picard B, Nassif X, Brisse S.** 2008. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* **9**:560.
4. **Escobar-Páramo P, Grenet K, Menac'h AL, Rode L, Salgado E, Amorin C, Gouriou S, Picard B, Rahimy MC, Andremont A, Denamur E, Ruimy R.** 2004. Large-Scale Population Structure of Human Commensal *Escherichia coli* Isolates. *Appl Environ Microbiol* **70**:5698–5700.
5. **Nowrouzian FL, Adlerberth I, Wold AE.** 2006. Enhanced persistence in the colonic microbiota of *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2: role of virulence

factors and adherence to colonic cells. *Microbes Infect* **8**:834–840.

6. **Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E.** 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **8**:207–217.
7. **Massot M, Daubié A-S, Clermont O, Jauréguy F, Couffignal C, Dahbi G, Mora A, Blanco J, Branger C, Mentré F, Eddi A, Picard B, Denamur E, the COLIVILLE Group.** 2016. Phylogenetic, virulence and antibiotic resistance characteristics of commensal strain populations of *Escherichia coli* from community subjects in the Paris area in 2010 and evolution over 30 years. *Microbiology* **162**:642–650.
8. **Dubois D, Baron O, Cougnoux A, Delmas J, Pradel N, Boury M, Bouchon B, Bringer M-A, Nougayrède J-P, Oswald E, Bonnet R.** 2011. ClbP Is a Prototype of a Peptidase Subgroup Involved in Biosynthesis of Nonribosomal Peptides. *J Biol Chem* **286**:35562–35570.
9. **Cougnoux A, Gibold L, Robin F, Dubois D, Pradel N, Darfeuille-Michaud A, Dalmaso G, Delmas J, Bonnet R.** 2012. Analysis of Structure–Function Relationships in the Colibactin-Maturing Enzyme ClbP. *J Mol Biol* **424**:203–214.
10. **Brotherton CA, Balskus EP.** 2013. A Prodrug Resistance Mechanism Is Involved in Colibactin Biosynthesis and Cytotoxicity. *J Am Chem Soc* **135**:3359–3362.
11. **Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrède J-P.** 2010. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* **107**:11537–11542.
12. **Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, Tomkovich S, Uronis JM, Fan T-J, Campbell BJ, Abujamel T, Dogan B, Rogers AB, Rhodes JM, Stintzi A, Simpson KW, Hansen JJ, Keku TO, Fodor AA, Jobin C.** 2012. Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota. *Science* **338**:120–123.
13. **Secher T, Samba-Louaka A, Oswald E, Nougayrède J-P.** 2013. *Escherichia coli* Producing Colibactin Triggers Premature and Transmissible Senescence in Mammalian Cells. *PLOS ONE* **8**:e77157.
14. **Payros D, Secher T, Boury M, Brehin C, Ménard S, Salvador-Cartier C, Cuevas-Ramos G, Watrin C, Marcq I, Nougayrède J-P, Dubois D, Bedu A, Garnier F, Clermont O, Denamur E, Plaisancié P, Theodorou V, Fioramonti J, Olier M, Oswald E.** 2014. Maternally acquired genotoxic *Escherichia coli* alters offspring's intestinal homeostasis. *Gut Microbes* **5**:313–512.
15. **Marcq I, Martin P, Payros D, Cuevas-Ramos G, Boury M, Watrin C, Nougayrède J-P, Olier M, Oswald E.** 2014. The Genotoxin Colibactin Exacerbates Lymphopenia and Decreases Survival Rate in Mice Infected With Septicemic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **210**:285–294.
16. **Cougnoux A, Dalmaso G, Martinez R, Buc E, Delmas J, Gibold L, Sauvanet P, Darcha C, Déchelotte P, Bonnet M, Pezet D, Wodrich H, Darfeuille-Michaud A, Bonnet R.** 2014. Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut* **63**:1932–1942.
17. **Nowrouzian FL, Oswald E.** 2012. *Escherichia coli* strains with the capacity for long-term persistence in the bowel microbiota carry the potentially genotoxic pks island. *Microb Pathog* **53**:180–182.
18. **Datsenko KA, Wanner BL.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6640–6645.

19. **Nougayrède J-P, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, Buchrieser C, Hacker J, Dobrindt U, Oswald E.** 2006. *Escherichia coli* Induces DNA Double-Strand Breaks in Eukaryotic Cells. *Science* **313**:848–851.
20. **Myhal ML, Laux DC, Cohen PS.** Relative colonizing abilities of human fecal and K 12 strains of *Escherichia coli* in the large intestines of streptomycin-treated mice. *Eur J Clin Microbiol* **1**:186–192.
21. **Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO.** 2007. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLOS Biol* **5**:e177.
22. **Gall TL, Clermont O, Gouriou S, Picard B, Nassif X, Denamur E, Tenailon O.** 2007. Extraintestinal Virulence Is a Coincidental By-Product of Commensalism in B2 Phylogenetic Group *Escherichia coli* Strains. *Mol Biol Evol* **24**:2373–2384.
23. **Smati M, Clermont O, Gal FL, Schichmanoff O, Jauréguy F, Eddi A, Denamur E, Picard B, Group for the C.** 2013. Real-Time PCR for Quantitative Analysis of Human Commensal *Escherichia coli* Populations Reveals a High Frequency of Subdominant Phylogroups. *Appl Environ Microbiol* **79**:5005–5012.
24. **Faïs T, Cougnoux A, Dalmaso G, Laurent F, Delmas J, Bonnet R.** 2016. Antibiotic activity of *Escherichia coli* against Multiresistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* AAC.00130-16.

Discussion et Perspectives

RÉGULATION DE LA COLIBACTINE

La colibactine est une toxine synthétisée par une machinerie complexe, codée par l'îlot génomique *pks* de 54kb. A l'image des facteurs de virulence, les gènes des îlots génomiques ne sont pas exprimés constitutivement, mais répondent à des signaux environnementaux, grâce à des régulateurs codés par l'îlot génomique ou non.

Le gène *clbR*, appartenant à l'îlot *pks*, code pour une protéine comportant un motif de liaison à l'ADN de type hélice-tour-hélice. Cette protéine présente des homologues avec les régulateurs de la famille LuxR, impliqués dans la communication inter-cellulaire, ou Quorum Sensing [139,215,317], et pourrait donc avoir un rôle de régulateur de l'îlot *pks*.

La régulation de l'expression des îlots génomiques doit être finement contrôlée, afin que les facteurs d'adaptation ou de virulence qu'ils codent soient synthétisés dans les conditions qui le nécessitent. Mes travaux de recherche ont pu mettre en évidence que la disponibilité en fer dans le milieu extracellulaire était capable de réguler l'expression du gène *clbA*, aboutissant à une régulation de la synthèse de la colibactine. Cette régulation se fait notamment *via* les deux régulateurs principaux de l'homéostasie du fer chez la bactérie, la protéine FUR (Ferric Uptake Regulator) et le petit ARN non-codant RyhB [318].

RyhB et Fur sont connus pour être impliqués dans la régulation d'un nombre important de facteurs de virulence, soit directement, soit indirectement *via* d'autres régulateurs transcriptionnels ou la modulation de la concentration intracellulaire de fer. Ils participent par exemple à régulation de l'invasion des cellules eucaryotes de bactéries telles que *Salmonella* et *Shigella* [255,319,320]. Ainsi, *Salmonella Typhimurium* envahit les cellules épithéliales grâce au système de sécrétion de type III (T3SS) codé par l'îlot de pathogénicité de *Salmonella* 1 (SP-1). Fur active le T3SS *via* l'induction de l'expression de *hilA*, un activateur de ce système [255,320]. RyhB favorise la formation de biofilm chez *V. cholerae* alors que chez *S. typhimurium*, le paralogue de RyhB, RyhB2, réprime la motilité [175]. RyhB et Fur sont également impliqués dans la production de toxines [175,319,321–323], le quorum sensing [263,286], la résistance au stress [289,324–328], la motilité et la formation de biofilm

[175,175,256]. Ceci permet à la bactérie de s'adapter à des environnements variés en ajustant l'expression de ses facteurs de virulence.

Un autre mécanisme de régulation fer-dépendant impliquant un régulateur supplémentaire, encore inconnu, a été mis en évidence dans mon travail de recherche (Tronnet *et al.*, en révision). Cette régulation de la biosynthèse de colibactine par le fer, et indépendante de RyhB et Fur, pourrait faire intervenir par exemple un système à deux-composants. Ceux-ci répondent à des stimuli extérieurs, et régulent positivement ou négativement un nombre important de gènes en réponse à ces stimuli. Par exemple chez *E. coli*, une quantité de Fe³⁺ élevée active le senseur PmrB, qui en retour phosphoryle le régulateur de réponse PmrA. Ce dernier se lie alors sur le promoteur de *qseBC* (*quorum sensing E. coli regulator B and C*) et induit l'expression de son opéron [329]. L'analyse *in silico* de l'îlot *pks* suggère la présence de deux sites de fixation putatifs de ce régulateur dans la région située en amont du gène *clbA*. Cependant, aucune donnée n'a été publiée concernant l'implication d'un système à deux composants dans la régulation de la biosynthèse de la colibactine.

D'autres régulateurs de la biosynthèse de la colibactine et codés par le *core genome*, (c'est à dire les gènes présents chez toutes les souches d'une même espèce bactérienne) de *E. coli* ont récemment été mis en évidence. En effet, l'implication de la protéine chaperonne Hsp90_{EC} et la protéase ClpQ, qui agiraient post-traductionnellement, a été démontrée par notre laboratoire [216]. Le mécanisme de régulation aboutissant à la modulation de la production de la colibactine par ces deux protéines reste inconnu. Par ailleurs, des données préliminaires suggèrent que le métabolisme des polyamines jouerait un rôle dans la biosynthèse de la colibactine au niveau de l'expression de certains gènes de l'îlot *pks* (Garcie *et al.*, communication personnelle).

Mes travaux de thèse se sont penchés plus précisément sur la régulation de la transcription du gène codant pour la PPTase ClbA. Si nous avons démontré qu'une quantité élevée de fer extracellulaire inhibait la transcription de *clbA*, aboutissant à une diminution de la synthèse de la colibactine, l'ajout d'un chélateur de fer a pour effet l'induction de ce gène. Cette induction est néanmoins associée à une diminution de la biosynthèse de colibactine et à une

augmentation de la production de sidérophores ClbA-dépendants. Ces résultats montrent que la biosynthèse de la colibactine s'effectue dans des conditions très spécifiques, notamment vis-à-vis de la quantité de fer (voir schéma-bilan Figure 31).

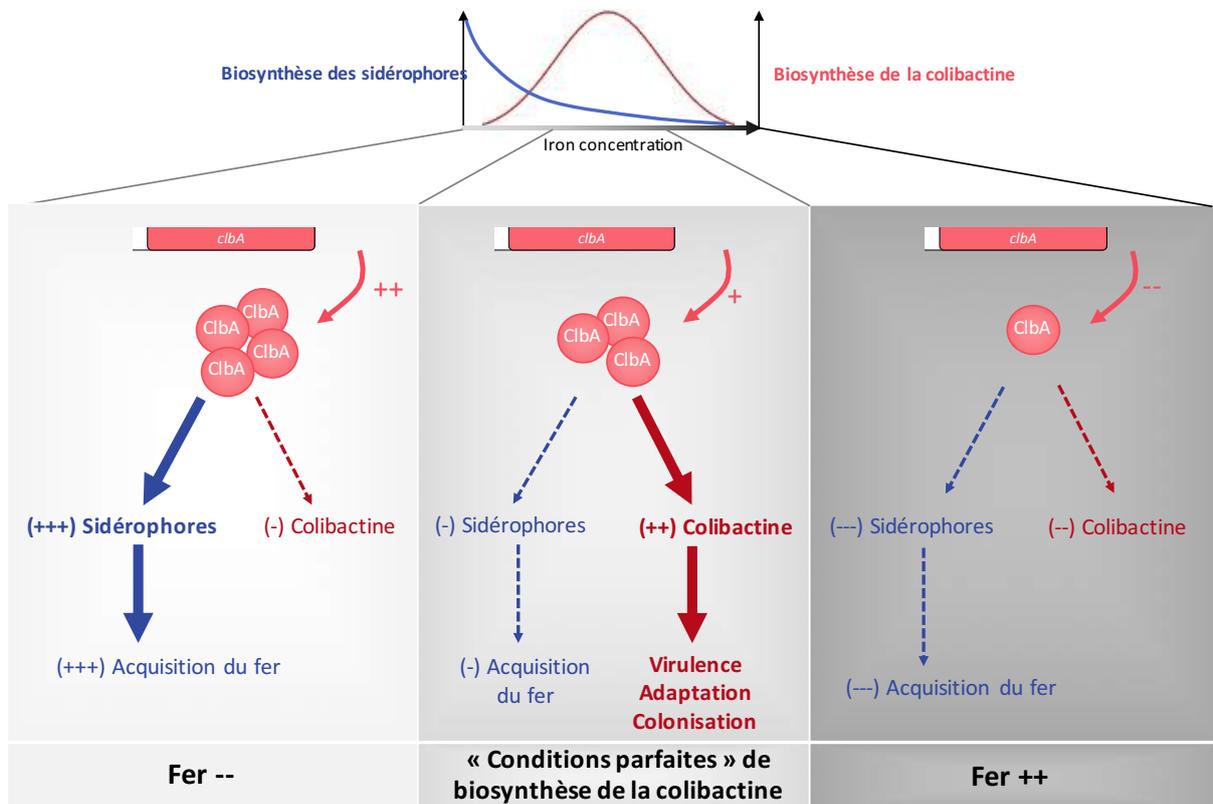


Figure 31 : Modèle général de la production de colibactine en fonction du fer

Nous privilégions l'hypothèse que ClbA pourrait être redirigée vers la synthèse des sidérophores lors d'une carence en fer. En effet, dans des conditions de carence en fer l'acquisition du fer est essentielle à la survie de la bactérie, qui va déployer un arsenal de mécanismes permettant l'acquisition du fer. La redirection de ClbA vers la synthèse des sidérophores pourrait permettre une meilleure efficacité dans l'acquisition du fer, et donc une meilleure adaptation à l'environnement, et donc une meilleure colonisation. Peu d'études relatent l'existence de PPTases pléiotropes permettant la synthèse de plusieurs molécules fonctionnellement différentes. Une PPTase chez *Streptomyces ambofaciens* a été identifiée comme jouant un rôle multiple, puisqu'elle est impliquée dans la biosynthèse à la fois des antibiotiques spuramycine (PK) et stambomycine (PK), mais aussi dans la synthèse de la coelicheline (NRP), un sidérophore [330]. La raison qui explique que certaines PPTases

assurent des fonctions pléiotropes, alors que d'autres restent spécifiques à la synthèse d'un seul composé, n'est pas encore connue.

Le mécanisme par lequel ClbA serait redirigée vers les sidérophores reste inconnu. Cependant, certaines PPTases possédant plusieurs sites actifs peuvent subir une régulation allostérique, comme cela a été suggéré pour la PPTase AcpS de *Bacillus subtilis* [331]. Une autre possibilité serait que les domaines porteurs (*carrier protein* ou CP) des sidérophores et/ou de la colibactine subissent un changement conformationnel en fonction de la quantité de fer dans le milieu, qui entraînerait une activation/diminution de l'interaction avec la PPTase. En effet, il a été montré par exemple que selon le pH, l'ACP de *V. harveyi* adoptait une conformation différente [332], qui pourrait aboutir à une modification de l'interaction avec les différentes enzymes avec lesquelles elle interagit.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en avant que la régulation de la synthèse de colibactine était complexe et multifactorielle. Elle soulève de nombreuses questions auxquelles nous pourrions tenter de répondre par des expériences complémentaires :

1°) Élucidation de l'implication directe ou indirecte de Fur et RyhB. Nous avons identifié la présence de deux Fur-boxes putatives en amont de *clbA*. La mutation de ces sites de fixation putatifs puis l'analyse de l'expression de *clbA* ou d'expériences de retard sur gel pourraient permettre l'identification du site de fixation spécifique de Fur sur *clbA*. Afin d'identifier le mécanisme de régulation de RyhB sur *clbA*, des expériences permettant de tester la stabilité/dégradation de l'ARN messager de *clbA* en fonction de la présence ou l'absence de RyhB pourraient être effectuées.

2°) Identification du régulateur fer-dépendant et distinct de Fur et RyhB. Pendant ma thèse, nous avons généré une banque de mutants par insertion aléatoire de transposons dans la souche Nissle 1917 contenant la fusion transcriptionnelle entre *clbA* et la luciférase (résultats non publiés). Le criblage de ces mutants dans différents milieux supplémentés en fer ou non, pourra permettre l'identification d'autres régulateurs de l'îlot *pks* relatifs au fer.

3°) Comprendre le mécanisme qui aboutit à une diminution de la biosynthèse de la colibactine en condition de carence en fer. Afin de tester l'hypothèse d'une répression d'un ou plusieurs

gènes de l'îlot *pks* lors d'une carence en fer, le suivi de la transcription des gènes de l'îlot *pks* à l'aide de fusions transcriptionnelles pourra être effectué. Comparer la production spécifique des sidérophores d'une souche sauvage, mutée pour *entD* ou mutée pour *clbA* pourrait être informatif. Cela permettrait d'identifier si ClbA est plus spécifiquement impliquée dans la synthèse d'un sidérophore ou de plusieurs sidérophores. Des approches, telles que l'électrophorèses sur gel de polyacrylamide pourraient permettre de tester la stabilité conformationnelle des domaines porteurs de la colibactine en fonction des conditions (milieu carencé en fer ou non).

L'ensemble de ces résultats, venant compléter la seule étude faisant l'objet de la régulation de l'îlot *pks* [215], indique que la régulation de cet îlot est complexe. En effet, la régulation de la colibactine implique l'intervention de régulateurs n'appartenant pas à l'îlot. De plus, il semblerait que les gènes de l'îlot soient différentiellement régulés en fonction des stimuli [215,216,318]. Par ailleurs, plusieurs études publiées récemment ont identifié de nombreux intermédiaires de synthèse de la colibactine [175,175,196,203,204,208,209], qui semblent en plus différer quantitativement selon les souches de *E. coli*, suggérant que les systèmes de régulation de la colibactine pourraient ne pas être les mêmes en fonction des souches. La régulation différentielle des gènes de l'îlot pourrait aussi modifier à la fois le type de métabolites synthétisés, ainsi que leurs quantités respectives.

Le fait que la biosynthèse de la colibactine soit régulée par différents signaux tels que la quantité de fer ou la réponse au stress permet une modulation fine de la production de cette toxine, jouant un rôle à la fois dans la virulence et dans la colonisation intestinale.

RÔLE DE LA COLIBACTINE ET DE LA CONNEXION COLIBACTINE/SIDÉROPHORES DANS LA COLONISATION INTESTINALE

La biosynthèse des polycétides et peptides non ribosomiaux a été observée chez les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux. Ces molécules, synthétisées indépendamment des ribosomes, couvrent un large panel de fonctions pharmacologiques, telles qu'antibiotiques, immunosuppressives, antiparasitaires, anticancéreuses, etc... [154,333]. La colibactine est un composé PK-NRP. Deux études récentes ont montré qu'elle jouait un rôle dans la virulence dans un modèle de méningite néonatale chez le rat [228] et dans un modèle de septicémie chez la souris [227].

La niche écologique primaire de *E. coli* est avant tout le tractus digestif, qu'elle colonise dès la naissance. Elle va y persister ensuite durablement tout au long de la vie [76]. Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes intéressés au rôle que pouvait avoir la colibactine dans la colonisation intestinale de souches qui la produisent.

Une étude épidémiologique analysant l'importance de l'îlot *pks* dans la capacité des souches à coloniser et persister dans le microbiote intestinal montre que parmi les souches résidentes de *E. coli*, la majorité portait l'îlot *pks*. Ces données suggèrent pour la première fois un rôle de cet îlot dans la capacité d'une souche de *E. coli* à coloniser et persister dans l'intestin [113]. Une autre étude publiée par notre laboratoire, cette fois-ci expérimentale, s'est intéressée au rôle de la colibactine dans un modèle expérimental de rat permettant la transmission verticale du microbiote, de la mère à l'enfant [224]. Les résultats tirés de cette étude, montrent que la présence ou non de l'îlot *pks* n'impacte pas la colonisation de l'intestin par *E. coli*. En effet, dans ce modèle, la colibactine n'influence ni la transmission de la souche dans le tractus intestinal du nouveau-né, ni le maintien de la souche chez l'adulte lorsque la souche est en mono-colonisation. Ces résultats ne corroborent pas avec ceux obtenus dans mon modèle murin de transmission verticale, et qui apportent l'évidence d'un rôle de la colibactine dans le maintien de *E. coli* dans l'intestin lorsque la souche est en mono-colonisation. En effet, même

si la colibactine ne semble pas intervenir dans la transmission des souches de *E. coli* chez le nouveau-né, elle semble néanmoins jouer un rôle dans la persistance et le maintien de la souche dans l'intestin. Les différences observées entre les résultats obtenus précédemment par Payros *et al.* et ceux obtenus dans le cadre de mon projet de recherche peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs qui diffèrent entre les deux modèles utilisés (modèle animal, nombre de gavages de la mère gestante, ...).

Mes résultats montrent que le rôle de la colibactine dans la colonisation/persistance dans le tractus intestinal transparait au moment où les souriceaux commencent progressivement à passer d'une alimentation maternelle lactée à une alimentation solide granulée, jusqu'au sevrage. Ce dernier induit un changement et une complexification de la flore intestinale, accompagné d'une maturation du système immunitaire [334,335]. C'est donc lorsque l'ensemble de ce système devient complexe que la colibactine semble jouer un rôle crucial dans la persistance des souches de *E. coli* la produisant. Le rôle de la colibactine dans la colonisation intestinale est confirmé également lorsque les souches sont en compétition. En effet, la perte de production de colibactine rend la souche qui la produisait plus permissive envers l'autre souche de *E. coli* avec laquelle elle est en compétition. Ainsi dans un environnement compétitif, la colibactine semble jouer un rôle dans la colonisation intestinale et dans la persistance des souches qui la produisent. Outre le fait que la colibactine soit un facteur de virulence, elle peut en premier lieu être vue comme un facteur déterminant pour la colonisation intestinale et un facteur de survie associé au commensalisme. Une étude suggère d'ailleurs, que les facteurs de virulence synthétisés par les souches du groupe phylogénétique B2 seraient en réalité à l'origine des facteurs de commensalisme [102].

La raison pour laquelle la colibactine représente un facteur de colonisation important n'est pas connue. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'avantage que les souches de *E. coli* colonisant l'intestin ont à produire la colibactine :

1°) Une première hypothèse implique une action antibiotique de la colibactine. En effet, Fais *et al.*, ont publié une étude portant sur le rôle antibiotique de la colibactine sur différentes

souches bactériennes [336]. Il en ressort que la souche produisant la colibactine a un effet antibiotique sur *Staphylococcus aureus*. En revanche, elle n'aurait aucun effet sur les *Staphylococcus aureus*, *Streptococci*, *Enterococci* et Entérobactéries. Elle montre aussi que la colibactine n'aurait aucun effet sur *Bacillus subtilis*. Une autre étude, publiée par Vizcaino *et al.*, montre en revanche que l'un des intermédiaires de synthèse de la colibactine a un effet antibiotique sur *Bacillus subtilis* [175]. Même si ces résultats semblent montrer que la colibactine ou l'un de ses intermédiaires auraient un effet antibiotique sur d'autres bactéries, ce mécanisme semble complexe, et dépendre des conditions d'expérimentation.

Néanmoins, en prenant en compte le fait que certains environnements riches mais compétitifs, tel que l'intestin, peuvent abriter un grand nombre de populations bactériennes, l'activité antibiotique de la colibactine pourrait procurer un avantage à la souche de *E. coli* qui la produit, et lui permettre ainsi de coloniser et persister dans une niche particulière, en éliminant ses concurrentes.

2°) Le laboratoire a mis en lumière une connexion entre la colibactine et les sidérophores grâce aux fonctions pléiotropes de ClbA, qui peut participer à la synthèse de ces deux types de métabolites fonctionnellement différents. Le maintien de la colonisation intestinale requiert un nombre important de capacités, dont la compétition pour les nutriments essentiels et l'adaptation de la réponse à une carence. Le groupe phylogénétique B2 a une capacité supérieure à acquérir le fer, puisqu'il est capable de synthétiser un large panel de sidérophores et d'exprimer ChuA, récepteur externe de l'hème, contrairement aux autres groupes phylogénétiques. De plus, au moins 50% de ces souches B2 synthétisent la colibactine. D'ailleurs, l'îlot génomique *pks* est systématiquement associé à l'îlot génomique HPI permettant la biosynthèse de la yersiniabactine [198]. La connexion entre la colibactine et les sidérophores pourrait constituer un avantage dans la colonisation, puisque la bactérie pourrait adapter la balance entre la synthèse de colibactine/sidérophores et donc les facteurs de virulence/fitness afin de produire au moment opportun le composé nécessaire.

Par ailleurs, dans certains cas, la colibactine ou l'un de ses intermédiaires de synthèse pourrait s'associer de manière covalente avec l'un des sidérophores synthétisés par la bactérie, et former ainsi un complexe appelé sidéromycine. En effet, les voies d'acquisition du fer utilisant des sidérophores peuvent aussi être utilisées pour véhiculer des

antibiotiques vers l'intérieur de la bactérie, sous forme de sidéromycine; une stratégie appelée « cheval de Troie » [312,313]. Par exemple, l'albomycine et la salmycine sont deux dérivés naturels du ferrichrome et de la ferrioxamine, respectivement, et transportés par le système Fhu chez les bactéries à la fois à Gram négatif ou à Gram positif [311,337].

Si les résultats préliminaires de mon travail de thèse concernant le rôle de la colibactine dans la colonisation intestinale, ont permis de montrer que la colibactine avait un rôle dans la colonisation de l'intestin, elle soulève encore de nombreuses questions auxquelles nous pourrions tenter de répondre par des expériences complémentaires :

1°) Quelle est la fonction biologique de la colibactine ? Afin d'étudier l'effet antibiotique de la colibactine et le rôle de la connexion entre sidérophores et colibactine, des expériences de compétition dans des milieux particuliers (carencés en fer, supplémentés en fer, pauvres, ...) entre des souches produisant la colibactine vis-à-vis de souches ne la produisant pas, pourraient permettre d'évaluer le potentiel antibiotique de la colibactine.

2°) Quels sont les effets de la colonisation de souches de *E. coli* produisant la colibactine sur le microbiote intestinal ? Pendant les expériences de colonisation, nous nous sommes concentrés sur le suivi de souches de *E. coli*, mais il serait également intéressant d'explorer les conséquences de la colonisation par ces souches produisant la colibactine sur le reste du microbiote. Afin d'analyser la composition du microbiote en fonction du temps et des souches inoculées (produisant la colibactine ou non), nous avons prélevé des échantillons de fèces et de colon tout au long des expériences. Ainsi, par qPCR ou pyroséquençage, il nous sera possible d'évaluer l'impact de la colonisation de l'intestin par des souches de *E. coli* produisant la colibactine sur la composition du microbiote et son évolution au cours du développement du souriceau jusqu'à l'âge adulte.

3°) Nous avons ici utilisé un modèle de colonisation stable et naturel, permettant l'implantation massive de souche de *E. coli* au sein d'une microflore endogène complexe.

L'utilisation d'autres modèles expérimentaux tels que le modèle axénique/gnotobiotique pourrait permettre d'évaluer le rôle de la colibactine lorsque la souche n'est pas en compétition avec d'autres espèces bactériennes. Nous avons d'ailleurs entrepris une collaboration avec l'équipe de Muriel Thomas de Jouy-en-Josas qui travaille sur des modèles murins axéniques. La mise en place de ce type de protocole pourra également nous permettre d'analyser les conséquences directes de la colonisation de souches de *E. coli* produisant la colibactine ou non sur son hôte.

HÔTE, FER ET ÉMERGENCE DU GROUPE PHYLOGÉNÉTIQUE B2

Le microbiote intestinal désigne l'ensemble de la population de microorganismes vivant au sein du tractus gastro-intestinal. Les bactéries du microbiote sont impliquées dans diverses fonctions comme la prévention des infections par les pathogènes, la digestion et la maturation du système immunitaire associé aux muqueuses [1]. Un dérèglement de ce microbiote peut entraîner ou être associé à des pathologies sévères telles que l'obésité, le diabète, l'inflammation chronique de l'intestin, les maladies chroniques respiratoires, les allergies alimentaires, les cancers, le SIDA, l'autisme, etc...[1,2].

L'alimentation du nouveau-né influence le développement du microbiote intestinal. L'implantation précoce d'une bactérie dans l'intestin favorise son maintien et sa persistance dans l'intestin tout au long de la vie de son hôte. Des études épidémiologiques montrent que des nouveau-nés nourris avec une formule infantile sont plus souvent colonisés avec *E. coli*, *C. difficile*, *B. fragilis* et les *Lactobacilles* que les enfants uniquement nourris au sein [23,37–39]. Une étude récente vient contredire ces données, en montrant que le nombre de *E. coli* est moins important chez les enfants nourris avec une formule infantile comparé aux enfants nourris au lait maternel. La quantité de fer des formules infantiles est en moyenne 10 à 60 fois plus importante que dans le lait maternel.

Les effets d'une carence ou d'une supplémentation en fer sur la modulation du microbiote et le développement de maladies font l'objet de nombreuses études connues (Werner *et al.*, 2011; Dostal *et al.*, 2012; Tompkins *et al.*, 2001.). Ainsi il a été montré que la supplémentation en fer alimentaire peut modifier l'équilibre du microbiote et favoriser la croissance de souches pathogènes plus que celle de souches qui sont bénéfiques, comme le décrivent quelques études. Par exemple, une étude menée chez des enfants kenyan a montré que la supplémentation en fer, en plus de causer une inflammation intestinale, aboutit à une augmentation de l'abondance de bactéries pathogènes telles que *Escherichia coli* [46]. Par

ailleurs, une étude menée en Afrique du Sud montre que la supplémentation en fer induit une augmentation du nombre d'entérobactéries, une diminution de lactobacilles, accompagné d'une augmentation de calprotectine, un marqueur de l'inflammation intestinale [52], confirmant l'étude effectuée par Zimmermann *et al.* et menée en Côte d'Ivoire [45]. L'environnement inflammatoire pourrait donner un avantage à *E. coli*, pour se multiplier dans l'intestin [338]. En effet, plusieurs études associent l'inflammation avec une augmentation de *E. coli* grâce par exemple à sa capacité à utiliser les nitrates, sous-produits résultants de la réponse inflammatoire de l'hôte [175,339].

Si la quantité de fer alimentaire influence composition du microbiote [45,55,340,341], les effets du microbiote sur l'homéostasie du fer chez l'hôte n'ont été que peu étudiés. Une étude récente montre que les bactéries de l'intestin induisent la diminution de l'expression des protéines DcytB (Duodenal Cytochrome B) et DMT1 (Divalent Metal Transporter 1), impliquées dans l'acquisition apicale du fer des cellules épithéliales. De plus, cette étude montre que les cellules intestinales de souris axéniques sont appauvries en fer, mais que la colonisation par des bactéries favorise le stockage du fer dans les cellules épithéliales via l'augmentation de la quantité de L-ferritine, [301]. Des résultats préliminaires non publiés et générés durant mon travail de recherche, nous suggèrent que l'expression de DMT1 et DcytB, deux protéines impliquées dans l'homéostasie du fer de la cellule intestinale, varie selon que la souche qui colonise l'intestin produise ou non la colibactine.

Si ma thèse a permis d'établir le lien entre la quantité de fer et la synthèse de colibactine chez la bactérie, et entre la colibactine et la colonisation intestinale, de nombreuses questions demeurent concernant l'impact de la quantité de fer chez l'hôte sur la colonisation de nos souches d'intérêt, de même que les effets de la colonisation par ces souches sur l'homéostasie du fer chez l'hôte. Plusieurs stratégies pourraient être employées afin d'essayer de répondre à ces deux questions :

1°) De plus en plus d'études examinent les conséquences de la supplémentation ou de la carence en fer sur la modulation de la composition du microbiote, *i.e.* des grands phyla qui le

composent [40,45,51,175,301]. Cependant, ces études ne se sont pas spécifiquement intéressées aux souches du groupe phylogénétique B2. Le suivi de la colonisation de ces souches, mutées ou non pour la synthèse de colibactine ou des sidérophores, en fonction de la quantité de fer alimentaire dans des modèles murins pourrait permettre de la mise en évidence d'un lien de causalité entre la quantité de fer et la colonisation intestinale de ces souches de *E. coli*. L'utilisation de différents fonds génétiques murins, anémiés ou surchargés en fer, pourrait également être envisagée.

2°) En parallèle, le suivi épidémiologique des souches de *E. coli* du groupe phylogénétique B2 qui produisent la colibactine chez des nouveau-nés permettrait d'établir un lien entre la colonisation de ces souches et l'alimentation du nourrisson (lait maternisé vs formule infantile). En effet, nous faisons l'hypothèse que l'alimentation par des formules infantiles privilégierait l'émergence du groupe phylogénétique B2, puisqu'il contient plus de fer.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Mes travaux ont permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme de régulation de l'îlot *pks* par RyhB et Fur, ainsi que par le fer. Cette étude a permis de compléter les connaissances concernant la régulation de la production de la colibactine, molécule impliquée dans de nombreux processus.

Dans la seconde partie de mon travail, nous avons montré que la colibactine, en plus d'être impliquée dans la virulence, favorisait le maintien des souches qui la produisent dans le tractus intestinal.

Regroupées, ces données (résumées dans le schéma-bilan Figure 32) donnent des pistes concernant l'explication de l'émergence du groupe phylogénétique B2 dans les pays développés.

Les bactéries du groupe phylogénétique B2 de *E. coli* portent le plus grand nombre de facteurs de virulence, et sont souvent associées au développement d'infections aiguës (septicémies, méningites, ...) ou chroniques (cancers, maladie de Crohn, allergies, ...). Donc essayer de comprendre les causes de cette émergence, c'est tenter d'expliquer l'apparition de plus en plus de maladies chroniques telles que les allergies, les cancers et les inflammations de l'intestin, et de trouver des solutions afin d'enrayer ou de modérer l'émergence du groupe phylogénétique B2 dans le microbiote intestinal.

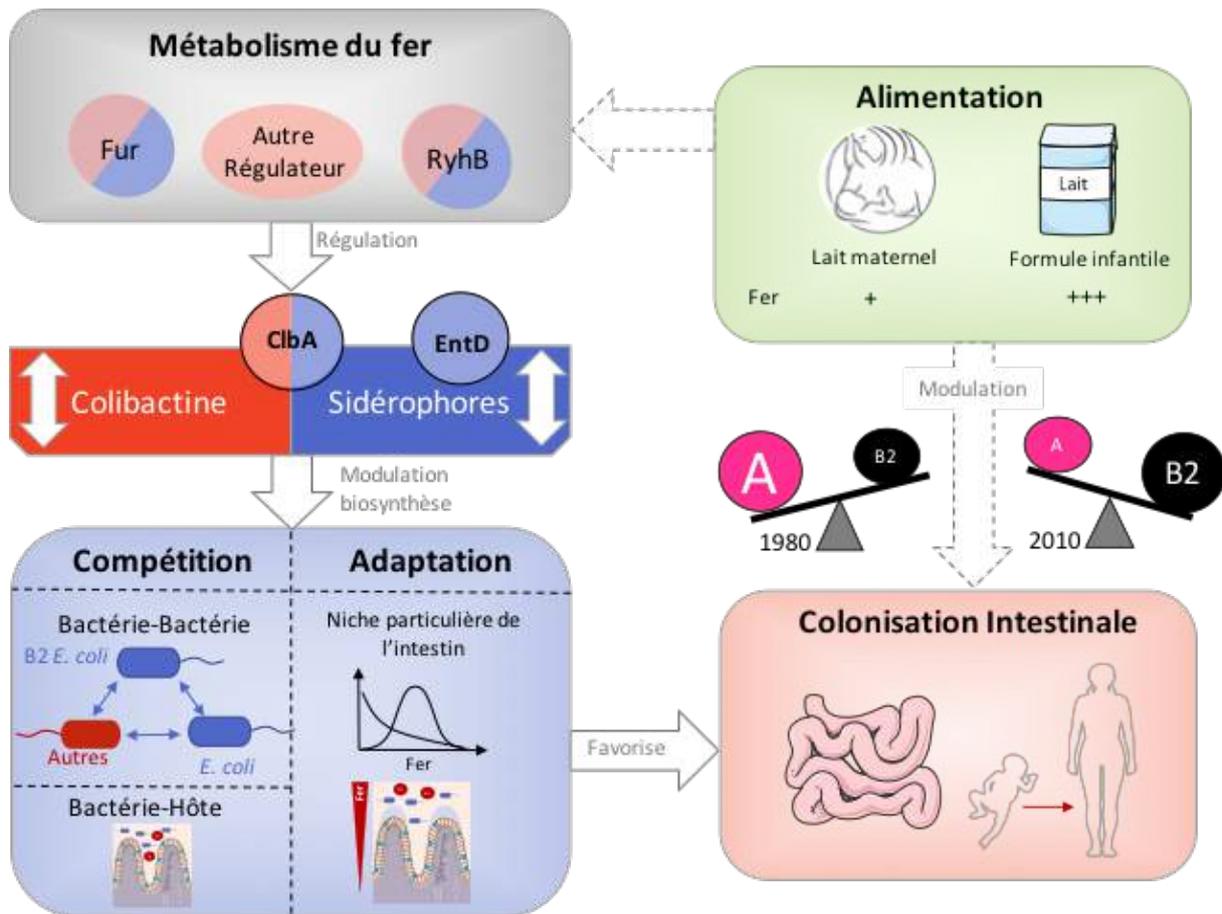


Figure 32. Facteurs pouvant expliquer l'émergence du groupe phylogénétique B2 de *E. coli*.

Les régulateurs majeurs du métabolisme du fer régulent la production de colibactine et des sidérophores. La modulation de la production de ces molécules favorise la compétition pour le fer entre les souches du groupe phylogénétique B2 de *E. coli* les différentes bactéries présentes dans l'intestin, mais aussi entre ces souches du groupe phylogénétique B2 de *E. coli* et l'hôte. La modulation de la production de colibactine et des sidérophores permet également une meilleure adaptation dans une niche dans l'intestin, en fonction notamment de la disponibilité en fer. Tous ces facteurs aboutissent à une meilleure colonisation de l'intestin. L'alimentation supplémentée en fer, comme par exemple les formules infantiles, va moduler la quantité de fer dans l'intestin, et donc moduler la production de colibactine et de sidérophores.

Références bibliographiques

1. Guarner F, Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. *The Lancet*. 2003;361: 512–519. doi:10.1016/S0140-6736(03)12489-0
2. Zhang Y-J, Li S, Gan R-Y, Zhou T, Xu D-P, Li H-B. Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases. *Int J Mol Sci*. 2015;16: 7493–7519. doi:10.3390/ijms16047493
3. Savage DC. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Annu Rev Microbiol*. 1977;31: 107–133. doi:10.1146/annurev.mi.31.100177.000543
4. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95: 6578–6583.
5. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh P, Ramey RR, Bircher JS, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*. 2008;320: 1647–1651. doi:10.1126/science.1155725
6. Mahowald MA, Rey FE, Seedorf H, Turnbaugh PJ, Fulton RS, Wollam A, et al. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106: 5859–5864. doi:10.1073/pnas.0901529106
7. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*. 2005;308: 1635–1638. doi:10.1126/science.1110591
8. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14: 20–32. doi:10.1038/nrmicro3552
9. O’Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*. 2006;7: 688–693. doi:10.1038/sj.embor.7400731
10. Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2001;280: G922–G929.
11. Johansson MEV, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105: 15064–15069. doi:10.1073/pnas.0803124105
12. Johansson MEV, Larsson JMH, Hansson GC. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host–microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108: 4659–4665. doi:10.1073/pnas.1006451107
13. Xu J, Bjursell MK, Himrod J, Deng S, Carmichael LK, Chiang HC, et al. A Genomic View of the Human-*Bacteroides thetaiotaomicron* Symbiosis. *Science*. 2003;299: 2074–2076. doi:10.1126/science.1080029
14. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch F, et al. Microbial Prevalence, Diversity and Abundance in Amniotic Fluid During Preterm Labor: A Molecular and Culture-Based Investigation. *PLOS ONE*. 2008;3: e3056. doi:10.1371/journal.pone.0003056
15. Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol*. 2008;159: 187–193. doi:10.1016/j.resmic.2007.12.007
16. Del Chierico F, Vernocchi P, Bonizzi L, Carsetti R, Castellazzi AM, Dallapiccola B, et al. Early-life gut microbiota under physiological and pathological conditions: The central role of

- combined meta-omics-based approaches. *J Proteomics*. 2012;75: 4580–4587. doi:10.1016/j.jprot.2012.02.018
17. Vael C, Desager K. The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Curr Opin Pediatr*. 2009;21: 794–800. doi:10.1097/MOP.0b013e328332351b
18. Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis*. 2015;26. doi:10.3402/mehd.v26.26050
19. Zoetendal EG, Akkermans ADL, De Vos WM. Temperature Gradient Gel Electrophoresis Analysis of 16S rRNA from Human Fecal Samples Reveals Stable and Host-Specific Communities of Active Bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64: 3854–3859.
20. Vanhoutte T, Huys G, Brandt E de, Swings J. Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers. *FEMS Microbiol Ecol*. 2004;48: 437–446. doi:10.1016/j.femsec.2004.03.001
21. Arrieta M-C, Stiemsma LT, Amenyogbe N, Brown EM, Finlay B. The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Immunother Vaccines*. 2014;5: 427. doi:10.3389/fimmu.2014.00427
22. Tamburini S, Shen N, Wu HC, Clemente JC. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nat Med*. 2016;22: 713–722. doi:10.1038/nm.4142
23. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy. *Pediatrics*. 2006;118: 511–521. doi:10.1542/peds.2005-2824
24. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107: 11971–11975. doi:10.1073/pnas.1002601107
25. Huurre A, Kalliomäki M, Rautava S, Rinne M, Salminen S, Isolauri E. Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology*. 2008;93: 236–240. doi:10.1159/111102
26. Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev*. 2010;86: 13–15. doi:10.1016/j.earlhumdev.2010.01.004
27. Adlerberth I, Strachan DP, Matricardi PM, Ahrné S, Orfei L, Åberg N, et al. Gut microbiota and development of atopic eczema in 3 European birth cohorts. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120: 343–350. doi:10.1016/j.jaci.2007.05.018
28. Salminen S, Gibson GR, McCartney AL, Isolauri E. Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut*. 2004;53: 1388–1389. doi:10.1136/gut.2004.041640
29. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108: 4578–4585. doi:10.1073/pnas.1000081107
30. Boehm G, Moro G. Structural and Functional Aspects of Prebiotics Used in Infant

Nutrition. J Nutr. 2008;138: 1818S–1828S.

31. Walker A. Breast Milk as the Gold Standard for Protective Nutrients. J Pediatr. 2010;156: S3–S7. doi:10.1016/j.jpeds.2009.11.021
32. Martín R, Heilig HG, Zoetendal EG, Jiménez E, Fernández L, Smidt H, et al. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. Res Microbiol. 2007;158: 31–37. doi:10.1016/j.resmic.2006.11.004
33. Collado M c., Delgado S, Maldonado A, Rodríguez J m. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. Lett Appl Microbiol. 2009;48: 523–528. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02567.x
34. Kent G. Global infant formula: monitoring and regulating the impacts to protect human health. Int Breastfeed J. 2015;10. doi:10.1186/s13006-014-0020-7
35. Haarman M, Knol J. Quantitative Real-Time PCR Assays To Identify and Quantify Fecal *Bifidobacterium* Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. Appl Environ Microbiol. 2005;71: 2318–2324. doi:10.1128/AEM.71.5.2318-2324.2005
36. Haarman M, Knol J. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal *Lactobacillus* Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. Appl Environ Microbiol. 2006;72: 2359–2365. doi:10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006
37. Stark PL, Lee A. The Microbial Ecology of the Large Bowel of Breastfed and Formula-fed Infants During the First Year of Life. J Med Microbiol. 1982;15: 189–203. doi:10.1099/00222615-15-2-189
38. Yoshioka H, Iseki K, Fujita K. Development and Differences of Intestinal Flora in the Neonatal Period in Breast-Fed and Bottle-Fed Infants. Pediatrics. 1983;72: 317–321.
39. Benno Y, Sawada K, Mitsuoka T. The Intestinal Microflora of Infants: Composition of Fecal Flora in Breast-Fed and Bottle-Fed Infants. Microbiol Immunol. 1984;28: 975–986. doi:10.1111/j.1348-0421.1984.tb00754.x
40. Bezirtzoglou E, Tsiotsias A, Welling GW. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). Anaerobe. 2011;17: 478–482. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.03.009
41. Domellöf M, Lönnerdal B, Dewey KG, Cohen RJ, Hernell O. Iron, zinc, and copper concentrations in breast milk are independent of maternal mineral status. Am J Clin Nutr. 2004;79: 111–115.
42. Krebs NF, Domellöf M, Ziegler E. Balancing Benefits and Risks of Iron Fortification in Resource-Rich Countries. J Pediatr. 2015;167: S20–S25. doi:10.1016/j.jpeds.2015.07.016
43. Balmer SE, Wharton BA. Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. Arch Dis Child. 1989;64: 1672–1677.
44. Balmer SE, Wharton BA. Diet and faecal flora in the newborn: iron. Arch Dis Child. 1991;66: 1390–1394.
45. Zimmermann MB, Chassard C, Rohner F, N’Goran EK, Nindjin C, Dostal A, et al. The effects of iron fortification on the gut microbiota in African children: a randomized controlled trial in Côte d’Ivoire. Am J Clin Nutr. 2010;92: 1406–1415. doi:10.3945/ajcn.110.004564
46. Jaeggi T, Kortman GAM, Moretti D, Chassard C, Holding P, Dostal A, et al. Iron

fortification adversely affects the gut microbiome, increases pathogen abundance and induces intestinal inflammation in Kenyan infants. *Gut*. 2015;64: 731–742. doi:10.1136/gutjnl-2014-307720

47. Lee SH, Shinde P, Choi J, Park M, Ohh S, Kwon IK, et al. Effects of Dietary Iron Levels on Growth Performance, Hematological Status, Liver Mineral Concentration, Fecal Microflora, and Diarrhea Incidence in Weanling Pigs. *Biol Trace Elem Res*. 2008;126: 57–68. doi:10.1007/s12011-008-8209-5

48. Werner T, Wagner SJ, Martínez I, Walter J, Chang J-S, Clavel T, et al. Depletion of luminal iron alters the gut microbiota and prevents Crohn's disease-like ileitis. *Gut*. 2011;60: 325–333. doi:10.1136/gut.2010.216929

49. Tompkins GR, O'Dell NL, Bryson IT, Pennington CB. The Effects of Dietary Ferric Iron and Iron Deprivation on the Bacterial Composition of the Mouse Intestine. *Curr Microbiol*. 43: 38–42. doi:10.1007/s002840010257

50. Benoni G, Cuzzolin L, Zambrieri D, Donini M, Del Soldato P, Caramazza I. Gastrointestinal effects of single and repeated doses of ferrous sulphate in rats. *Pharmacol Res*. 1993;27: 73–80. doi:10.1006/phrs.1993.1007

51. Dostal A, Chassard C, Hilty FM, Zimmermann MB, Jaeggi T, Rossi S, et al. Iron Depletion and Repletion with Ferrous Sulfate or Electrolytic Iron Modifies the Composition and Metabolic Activity of the Gut Microbiota in Rats. *J Nutr*. 2012;142: 271–277. doi:10.3945/jn.111.148643

52. Dostal A, Baumgartner J, Riesen N, Chassard C, Smuts CM, Zimmermann MB, et al. Effects of iron supplementation on dominant bacterial groups in the gut, faecal SCFA and gut inflammation: a randomised, placebo-controlled intervention trial in South African children. *Br J Nutr*. 2014;112: 547–556. doi:10.1017/S0007114514001160

53. Ettoreiki C, Gadonna-Widehem P, Mangin I, Coëffier M, Delayre-Orthez C, Anton PM. Juvenile ferric iron prevents microbiota dysbiosis and colitis in adult rodents. *World J Gastroenterol WJG*. 2012;18: 2619–2629. doi:10.3748/wjg.v18.i21.2619

54. Payne AN, Zihler A, Chassard C, Lacroix C. Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. *Trends Biotechnol*. 2012;30: 17–25. doi:10.1016/j.tibtech.2011.06.011

55. Kortman GAM, Raffatellu M, Swinkels DW, Tjalsma H. Nutritional iron turned inside out: intestinal stress from a gut microbial perspective. *FEMS Microbiol Rev*. 2014;38: 1202–1234. doi:10.1111/1574-6976.12086

56. van Elsas JD, Semenov AV, Costa R, Trevors JT. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *ISME J*. 2011;5: 173–183. doi:10.1038/ismej.2010.80

57. Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect*. 2003;5: 449–456. doi:10.1016/S1286-4579(03)00049-2

58. Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ*. 2003;81: 197–204. doi:10.1590/S0042-96862003000300010

59. Dobrindt U. (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*. 2005;295: 357–371. doi:10.1016/j.ijmm.2005.07.009
60. Kaper JB. Pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*. 2005;295: 355–356. doi:10.1016/j.ijmm.2005.06.008
61. Orskov I, Sharma V, Orskov F. Genetic mapping of the K1 and K4 antigens (L) of *Escherichia coli*. Non-allelism of K(L) antigens with K antigens of O8:K27(A), O8:K8(L) and O9:K57(B). *Acta Pathol Microbiol Scand [B]*. 1976;84: 125–131.
62. Ochman H, Selander RK. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol*. 1984;157: 690–693.
63. Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol*. 1986;51: 873–884.
64. Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1990;172: 6175–6181.
65. Jaureguy F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, et al. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics*. 2008;9: 560. doi:10.1186/1471-2164-9-560
66. Gordon DM, Clermont O, Tolley H, Denamur E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol*. 2008;10: 2484–2496. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01669.x
67. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep*. 2013;5: 58–65. doi:10.1111/1758-2229.12019
68. Turret J, Denamur E. Population Phylogenomics of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*. 2016;4. doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0010-2012
69. Touchon M, Hoede C, Tenailon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, et al. Organised Genome Dynamics in the *Escherichia coli* Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths. *PLOS Genet*. 2009;5: e1000344. doi:10.1371/journal.pgen.1000344
70. Lukjancenko O, Wassenaar TM, Ussery DW. Comparison of 61 Sequenced *Escherichia coli* Genomes. *Microb Ecol*. 2010;60: 708–720. doi:10.1007/s00248-010-9717-3
71. Kaas RS, Friis C, Ussery DW, Aarestrup FM. Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes. *BMC Genomics*. 2012;13: 577. doi:10.1186/1471-2164-13-577
72. Medini D, Donati C, Tettelin H, Masignani V, Rappuoli R. The microbial pan-genome. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15: 589–594. doi:10.1016/j.gde.2005.09.006
73. Tettelin H, Riley D, Cattuto C, Medini D. Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11: 472–477. doi:10.1016/j.mib.2008.09.006
74. Hendrickson H. Order and Disorder during *Escherichia coli* Divergence. *PLOS Genet*. 2009;5: e1000335. doi:10.1371/journal.pgen.1000335
75. Soucy SM, Huang J, Gogarten JP. Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat*

Rev Genet. 2015;16: 472–482. doi:10.1038/nrg3962

76. Conway T, Krogfelt KA, Cohen PS. The Life of Commensal *Escherichia coli* in the Mammalian Intestine. *EcoSal Plus*. 2004;1. doi:10.1128/ecosalplus.8.3.1.2

77. Kühn I, Tullus K, Möllby R. Colonization and persistence of *Escherichia coli* phenotypes in the intestines of children aged 0 to 18 months. *Infection*. 1986;14: 7–12.

78. Freter R. Factors affecting the microecology of the gut. 1992; 111–144. doi:10.1007/978-94-011-2364-8_6

79. Freter R. Mechanisms of association of bacteria with mucosal surfaces. *Ciba Found Symp*. 1981;80: 36–55.

80. Freter R, Brickner H, Fekete J, Vickerman MM, Carey KE. Survival and Implantation of *Escherichia coli* in the Intestinal Tract. *Infect Immun*. 1983;39: 686–703.

81. Miranda RL, Conway T, Leatham MP, Chang DE, Norris WE, Allen JH, et al. Glycolytic and Gluconeogenic Growth of *Escherichia coli* O157:H7 (EDL933) and *E. coli* K-12 (MG1655) in the Mouse Intestine. *Infect Immun*. 2004;72: 1666–1676. doi:10.1128/IAI.72.3.1666-1676.2004

82. Chang D-E, Smalley DJ, Tucker DL, Leatham MP, Norris WE, Stevenson SJ, et al. Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101: 7427–7432. doi:10.1073/pnas.0307888101

83. Schinner SAC, Mokszycki ME, Adediran J, Jensen ML, Conway T, Cohen PS. *Escherichia coli* EDL933 Requires Gluconeogenic Nutrients to Successfully Colonize the Intestines of Streptomycin-Treated Mice Pre-colonized with *E. coli* Nissle 1917. *Infect Immun*. 2015; IAI.02943-14. doi:10.1128/IAI.02943-14

84. Li H, Limenitakis JP, Fuhrer T, Geuking MB, Lawson MA, Wyss M, et al. The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. *Nat Commun*. 2015;6. doi:10.1038/ncomms9292

85. Poulsen LK, Lan F, Kristensen CS, Hobolth P, Molin S, Krogfelt KA. Spatial distribution of *Escherichia coli* in the mouse large intestine inferred from rRNA in situ hybridization. *Infect Immun*. 1994;62: 5191–5194.

86. Sweeney NJ, Laux DC, Cohen PS. *Escherichia coli* F-18 and *E. coli* K-12 *eda* mutants do not colonize the streptomycin-treated mouse large intestine. *Infect Immun*. 1996;64: 3504–3511.

87. Peekhaus N, Conway T. What's for Dinner?: Entner-Doudoroff Metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1998;180: 3495–3502.

88. Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M, Hinton JCD. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*. 2003;47: 103–118. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03313.x

89. Patra T, Koley H, Ramamurthy T, Ghose AC, Nandy RK. The Entner-Doudoroff Pathway Is Obligatory for Gluconate Utilization and Contributes to the Pathogenicity of *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*. 2012;194: 3377–3385. doi:10.1128/JB.06379-11

90. Steinsiek S, Frixel S, Stagge S, Bettenbrock K. Characterization of *E. coli* MG1655 and *frdA* and *sdhC* mutants at various aerobiosis levels. *J Biotechnol*. 2011;154: 35–45.

doi:10.1016/j.jbiotec.2011.03.015

91. Leatham MP, Banerjee S, Autieri SM, Mercado-Lubo R, Conway T, Cohen PS. Precolonized Human Commensal *Escherichia coli* Strains Serve as a Barrier to E. coli O157:H7 Growth in the Streptomycin-Treated Mouse Intestine. *Infect Immun*. 2009;77: 2876–2886. doi:10.1128/IAI.00059-09
92. Bergthorsson U, Ochman H. Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol*. 1998;15: 6–16.
93. Dobrindt U, Agerer F, Michaelis K, Janka A, Buchrieser C, Samuelson M, et al. Analysis of Genome Plasticity in Pathogenic and Commensal *Escherichia coli* Isolates by Use of DNA Arrays. *J Bacteriol*. 2003;185: 1831–1840. doi:10.1128/JB.185.6.1831-1840.2003
94. Fabich AJ, Jones SA, Chowdhury FZ, Cernosek A, Anderson A, Smalley D, et al. Comparison of Carbon Nutrition for Pathogenic and Commensal *Escherichia coli* Strains in the Mouse Intestine. *Infect Immun*. 2008;76: 1143–1152. doi:10.1128/IAI.01386-07
95. Maltby R, Leatham-Jensen MP, Gibson T, Cohen PS, Conway T. Nutritional Basis for Colonization Resistance by Human Commensal *Escherichia coli* Strains HS and Nissle 1917 against E. coli O157:H7 in the Mouse Intestine. *PLOS ONE*. 2013;8: e53957. doi:10.1371/journal.pone.0053957
96. Hoskins LC, Agustines M, McKee WB, Boulding ET, Kriaris M, Niedermeyer G. Mucin degradation in human colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degrade ABH blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins. *J Clin Invest*. 1985;75: 944. doi:10.1172/JCI111795
97. Salyers AA, Pajeau M. Competitiveness of different polysaccharide utilization mutants of *Bacteroides thetaiotaomicron* in the intestinal tracts of germfree mice. *Appl Environ Microbiol*. 1989;55: 2572–2578.
98. Comstock LE, Coyne MJ. *Bacteroides thetaiotaomicron*: a dynamic, niche-adapted human symbiont. *BioEssays*. 2003;25: 926–929. doi:10.1002/bies.10350
99. Martens EC, Chiang HC, Gordon JI. Mucosal Glycan Foraging Enhances Fitness and Transmission of a Saccharolytic Human Gut Bacterial Symbiont. *Cell Host Microbe*. 2008;4: 447–457. doi:10.1016/j.chom.2008.09.007
100. Goodman AL, McNulty NP, Zhao Y, Leip D, Mitra RD, Lozupone CA, et al. Identifying Genetic Determinants Needed to Establish a Human Gut Symbiont in Its Habitat. *Cell Host Microbe*. 2009;6: 279–289. doi:10.1016/j.chom.2009.08.003
101. Ng KM, Ferreyra JA, Higginbottom SK, Lynch JB, Kashyap PC, Gopinath S, et al. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature*. 2013;502: 96–99. doi:10.1038/nature12503
102. Gall TL, Clermont O, Gouriou S, Picard B, Nassif X, Denamur E, et al. Extraintestinal Virulence Is a Coincidental By-Product of Commensalism in B2 Phylogenetic Group *Escherichia coli* Strains. *Mol Biol Evol*. 2007;24: 2373–2384. doi:10.1093/molbev/msm172
103. Clermont O, Christenson JK, Daubié A-S, Gordon DM, Denamur E. Development of an allele-specific PCR for *Escherichia coli* B2 sub-typing, a rapid and easy to perform substitute of multilocus sequence typing. *J Microbiol Methods*. 2014;101: 24–27. doi:10.1016/j.mimet.2014.03.008

104. Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, et al. The Link between Phylogeny and Virulence in *Escherichia coli* Extraintestinal Infection. *Infect Immun*. 1999;67: 546–553.
105. Skurnik D, Bonnet D, Bernède-Bauduin C, Michel R, Guette C, Becker J-M, et al. Characteristics of human intestinal *Escherichia coli* with changing environments. *Environ Microbiol*. 2008;10: 2132–2137. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01636.x
106. Gordon DM, Stern SE, Collignon PJ. Influence of the age and sex of human hosts on the distribution of *Escherichia coli* ECOR groups and virulence traits. *Microbiology*. 2005;151: 15–23. doi:10.1099/mic.0.27425-0
107. Escobar-Páramo P, Le Menac’h A, Le Gall T, Amarin C, Gouriou S, Picard B, et al. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environ Microbiol*. 2006;8: 1975–1984. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01077.x
108. Massot M, Daubié A-S, Clermont O, Jauréguy F, Couffignal C, Dahbi G, et al. Phylogenetic, virulence and antibiotic resistance characteristics of commensal strain populations of *Escherichia coli* from community subjects in the Paris area in 2010 and evolution over 30 years. *Microbiology*. 2016;162: 642–650. doi:10.1099/mic.0.000242
109. Escobar-Páramo P, Grenet K, Menac’h AL, Rode L, Salgado E, Amarin C, et al. Large-Scale Population Structure of Human Commensal *Escherichia coli* Isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70: 5698–5700. doi:10.1128/AEM.70.9.5698-5700.2004
110. Unno T, Han D, Jang J, Lee S-N, Ko G, Choi HY, et al. Absence of *Escherichia coli* Phylogenetic Group B2 Strains in Humans and Domesticated Animals from Jeonnam Province, Republic of Korea. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75: 5659–5666. doi:10.1128/AEM.00443-09
111. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8: 207–217. doi:10.1038/nrmicro2298
112. Nowrouzian FL, Wold AE, Adlerberth I. *Escherichia coli* Strains Belonging to Phylogenetic Group B2 Have Superior Capacity to Persist in the Intestinal Microflora of Infants. *J Infect Dis*. 2005;191: 1078–1083. doi:10.1086/427996
113. Nowrouzian FL, Adlerberth I, Wold AE. Enhanced persistence in the colonic microbiota of *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2: role of virulence factors and adherence to colonic cells. *Microbes Infect*. 2006;8: 834–840. doi:10.1016/j.micinf.2005.10.011
114. Malik VS. Microbial secondary metabolism. *Trends Biochem Sci*. 1980;5: 68–72. doi:10.1016/0968-0004(80)90071-7
115. Walsh CT. Polyketide and Nonribosomal Peptide Antibiotics: Modularity and Versatility. *Science*. 2004;303: 1805–1810. doi:10.1126/science.1094318
116. Walsh CT. Insights into the chemical logic and enzymatic machinery of NRPS assembly lines. *Nat Prod Rep*. 2016;33: 127–135. doi:10.1039/C5NP00035A
117. Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2008;13: 894–901. doi:10.1016/j.drudis.2008.07.004
118. Fischbach MA, Walsh CT. Assembly-Line Enzymology for Polyketide and Nonribosomal Peptide Antibiotics: Logic, Machinery, and Mechanisms. *Chem Rev*. 2006;106: 3468–3496.

doi:10.1021/cr0503097

119. Finking R, Marahiel MA. Biosynthesis of Nonribosomal Peptides. *Annu Rev Microbiol.* 2004;58: 453–488. doi:10.1146/annurev.micro.58.030603.123615
120. Beld J, Sonnenschein EC, Vickery CR, Noel JP, Burkart MD. The phosphopantetheinyl transferases: catalysis of a post-translational modification crucial for life. *Nat Prod Rep.* 2013;31: 61–108. doi:10.1039/C3NP70054B
121. Crosby J, Crump MP. The structural role of the carrier protein – active controller or passive carrier. *Nat Prod Rep.* 2012;29: 1111–1137. doi:10.1039/C2NP20062G
122. L. Condurso H, D. Bruner S. Structure and noncanonical chemistry of nonribosomal peptide biosynthetic machinery. *Nat Prod Rep.* 2012;29: 1099–1110. doi:10.1039/C2NP20023F
123. Lambalot RH, Gehring AM, Flugel RS, Zuber P, LaCelle M, Marahiel MA, et al. A new enzyme superfamily — the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol.* 1996;3: 923–936. doi:10.1016/S1074-5521(96)90181-7
124. Joshi AK, Zhang L, Rangan VS, Smith S. Cloning, Expression, and Characterization of a Human 4'-Phosphopantetheinyl Transferase with Broad Substrate Specificity. *J Biol Chem.* 2003;278: 33142–33149. doi:10.1074/jbc.M305459200
125. Gehring AM, Mori I, Walsh CT. Reconstitution and Characterization of the *Escherichia coli* Enterobactin Synthetase from EntB, EntE, and EntF. *Biochemistry (Mosc).* 1998;37: 2648–2659. doi:10.1021/bi9726584
126. Martin P, Marcq I, Magistro G, Penary M, Garcie C, Payros D, et al. Interplay between Siderophores and Colibactin Genotoxin Biosynthetic Pathways in *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* 2013;9. doi:10.1371/journal.ppat.1003437
127. Fichtlscherer F, Wellein C, Mittag M, Schweizer E. A novel function of yeast fatty acid synthase. *Eur J Biochem.* 2000;267: 2666–2671. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01282.x
128. Parris KD, Lin L, Tam A, Mathew R, Hixon J, Stahl M, et al. Crystal structures of substrate binding to *Bacillus subtilis* holo-(acyl carrier protein) synthase reveal a novel trimeric arrangement of molecules resulting in three active sites. *Structure.* 2000;8: 883–895. doi:10.1016/S0969-2126(00)00178-7
129. Weissman KJ, Hong H, Popovic B, Meersman F. Evidence for a Protein-Protein Interaction Motif on an Acyl Carrier Protein Domain from a Modular Polyketide Synthase. *Chem Biol.* 2006;13: 625–636. doi:10.1016/j.chembiol.2006.04.010
130. Quadri LE, Weinreb PH, Lei M, Nakano MM, Zuber P, Walsh CT. Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry (Mosc).* 1998;37: 1585–1595. doi:10.1021/bi9719861
131. Sánchez C, Du L, Edwards DJ, Toney MD, Shen B. Cloning and characterization of a phosphopantetheinyl transferase from *Streptomyces verticillus* ATCC15003, the producer of the hybrid peptide–polyketide antitumor drug bleomycin. *Chem Biol.* 2001;8: 725–738. doi:10.1016/S1074-5521(01)00047-3
132. Finking R, Solsbacher J, Konz D, Schobert M, Schäfer A, Jahn D, et al. Characterization of a New Type of Phosphopantetheinyl Transferase for Fatty Acid and Siderophore Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.* 2002;277: 50293–50302.

doi:10.1074/jbc.M205042200

133. Mofid MR, Finking R, Marahiel MA. Recognition of Hybrid Peptidyl Carrier Proteins/Acyl Carrier Proteins in Nonribosomal Peptide Synthetase Modules by the 4'-Phosphopantetheinyl Transferases AcpS and Sfp. *J Biol Chem*. 2002;277: 17023–17031.

134. Mofid MR, Finking R, Essen LO, Marahiel MA. Structure-Based Mutational Analysis of the 4'-Phosphopantetheinyl Transferases Sfp from *Bacillus subtilis*: Carrier Protein Recognition and Reaction Mechanism,. *Biochemistry (Mosc)*. 2004;43: 4128–4136. doi:10.1021/bi036013h

135. Dym O, Albeck S, Peleg Y, Schwarz A, Shakked Z, Burstein Y, et al. Structure–Function Analysis of the Acyl Carrier Protein Synthase (AcpS) from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Biol*. 2009;393: 937–950. doi:10.1016/j.jmb.2009.08.065

136. Bunkoczi G, Pasta S, Joshi A, Wu X, Kavanagh KL, Smith S, et al. Mechanism and Substrate Recognition of Human Holo ACP Synthase. *Chem Biol*. 2007;14: 1243–1253. doi:10.1016/j.chembiol.2007.10.013

137. Reuter K, Mofid MR, Marahiel MA, Ficner R. Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *EMBO J*. 1999;18: 6823–6831. doi:10.1093/emboj/18.23.6823

138. Crosa JH, Walsh CT. Genetics and Assembly Line Enzymology of Siderophore Biosynthesis in Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002;66: 223–249. doi:10.1128/MMBR.66.2.223-249.2002

139. Nougayrède J-P, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, et al. *Escherichia coli* Induces DNA Double-Strand Breaks in Eukaryotic Cells. *Science*. 2006;313: 848–851. doi:10.1126/science.1127059

140. Andrews S, Norton I, Salunkhe AS, Goodluck H, Aly WSM, Mourad-Agha H, et al. Control of iron metabolism in bacteria. *Met Ions Life Sci*. 2013;12: 203–239. doi:10.1007/978-94-007-5561-1_7

141. Schröder I, Johnson E, Vries S de. Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol Rev*. 2003;27: 427–447. doi:10.1016/S0168-6445(03)00043-3

142. Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quñones F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev*. 2003;27: 215–237. doi:10.1016/S0168-6445(03)00055-X

143. Posey JE, Gherardini FC. Lack of a Role for Iron in the Lyme Disease Pathogen. *Science*. 2000;288: 1651–1653. doi:10.1126/science.288.5471.1651

144. Ratledge C. Iron metabolism and infection. *Food Nutr Bull*. 2007;28: S515-523.

145. Gray-Owen SD, Schyvers AB. Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol*. 1996;4: 185–191. doi:10.1016/0966-842X(96)10025-1

146. Braun V. Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol*. 2001;291: 67–79. doi:10.1078/1438-4221-00103

147. Morgenthau A, Pogoutse A, Adamiak P, Moraes TF, Schryvers AB. Bacterial receptors for host transferrin and lactoferrin: molecular mechanisms and role in host–microbe interactions. *Future Microbiol*. 2013;8: 1575–1585. doi:10.2217/fmb.13.125

148. Chu BC, Garcia-Herrero A, Johanson TH, Krewulak KD, Lau CK, Peacock RS, et al.

- Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *BioMetals*. 2010;23: 601–611. doi:10.1007/s10534-010-9361-x
149. Saha R, Saha N, Donofrio RS, Bestervelt LL. Microbial siderophores: a mini review. *J Basic Microbiol*. 2013;53: 303–317. doi:10.1002/jobm.201100552
150. Deneer HG, Healey V, Boychuk I. Reduction of exogenous ferric iron by a surface-associated ferric reductase of *Listeria spp.* *Microbiology*. 1995;141: 1985–1992. doi:10.1099/13500872-141-8-1985
151. Tong Y, Guo M. Bacterial heme-transport proteins and their heme-coordination modes. *Arch Biochem Biophys*. 2009;481: 1–15. doi:10.1016/j.abb.2008.10.013
152. Contreras H, Chim N, Credali A, Goulding CW. Heme uptake in bacterial pathogens. *Curr Opin Chem Biol*. 2014;19: 34–41. doi:10.1016/j.cbpa.2013.12.014
153. Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2007;71: 413–451. doi:10.1128/MMBR.00012-07
154. Walsh CT. The Chemical Versatility of Natural-Product Assembly Lines. *Acc Chem Res*. 2008;41: 4–10. doi:10.1021/ar7000414
155. Faraldo-Gómez JD, Sansom MSP. Acquisition of siderophores in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4: 105–116. doi:10.1038/nrm1015
156. Winkelmann G. Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem Soc Trans*. 2002;30: 691–696. doi:10.1042/bst0300691
157. Hider RC, Kong X. Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep*. 2010;27: 637–657. doi:10.1039/B906679A
158. Garénaux A, Caza M, Dozois CM. The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol*. 2011;153: 89–98. doi:10.1016/j.vetmic.2011.05.023
159. Oves-Costales D, Kadi N, L. Challis G. The long-overlooked enzymology of a nonribosomal peptide synthetase-independent pathway for virulence-conferring siderophore biosynthesis. *Chem Commun*. 2009;0: 6530–6541. doi:10.1039/B913092F
160. Gibson F, Magrath DI. The isolation and characterization of a hydroxamic acid (aerobactin) formed by *Aerobacter aerogenes* 62-l. *Biochim Biophys Acta*. 1969;192: 175–184.
161. Furrer JL, Sanders DN, Hook-Barnard IG, McIntosh MA. Export of the siderophore enterobactin in *Escherichia coli*: involvement of a 43 kDa membrane exporter. *Mol Microbiol*. 2002;44: 1225–1234. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02885.x
162. Bleuel C, Große C, Taudte N, Scherer J, Wesenberg D, Krauß GJ, et al. TolC Is Involved in Enterobactin Efflux across the Outer Membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2005;187: 6701–6707. doi:10.1128/JB.187.19.6701-6707.2005
163. Higgs PI, Larsen RA, Postle K. Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. *Mol Microbiol*. 2002;44: 271–281. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02880.x
164. Ratledge C, Dover LG. Iron Metabolism in Pathogenic Bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54: 881–941. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.881

165. Abergel RJ, Moore EG, Strong RK, Raymond KN. Microbial Evasion of the Immune System: Structural Modifications of Enterobactin Impair Siderocalin Recognition. *J Am Chem Soc.* 2006;128: 10998–10999. doi:10.1021/ja062476+
166. Jin B, Newton SMC, Shao Y, Jiang X, Charbit A, Klebba PE. Iron acquisition systems for ferric hydroxamates, haemin and haemoglobin in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* 2006;59: 1185–1198. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.05015.x
167. Lawlor MS, O'Connor C, Miller VL. Yersiniabactin Is a Virulence Factor for *Klebsiella pneumoniae* during Pulmonary Infection. *Infect Immun.* 2007;75: 1463–1472. doi:10.1128/IAI.00372-06
168. Crouch M-LV, Castor M, Karlinsey JE, Kalhorn T, Fang FC. Biosynthesis and IroC-dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Mol Microbiol.* 2008;67: 971–983. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.06089.x
169. Jimenez PN, Koch G, Papaioannou E, Wahjudi M, Krzeslak J, Coenye T, et al. Role of PvdQ in *Pseudomonas aeruginosa* virulence under iron-limiting conditions. *Microbiology.* 2010;156: 49–59. doi:10.1099/mic.0.030973-0
170. Fetherston JD, Kirillina O, Bobrov AG, Paulley JT, Perry RD. The Yersiniabactin Transport System Is Critical for the Pathogenesis of Bubonic and Pneumonic Plague. *Infect Immun.* 2010;78: 2045–2052. doi:10.1128/IAI.01236-09
171. Caza M, Lépine F, Dozois CM. Secretion, but not overall synthesis, of catecholate siderophores contributes to virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2011;80: 266–282. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07570.x
172. Su Q, Guan T, Lv H. Siderophore biosynthesis coordinately modulated the virulence-associated interactive metabolome of uropathogenic *Escherichia coli* and human urine. *Sci Rep.* 2016;6. doi:10.1038/srep24099
173. Minandri F, Imperi F, Frangipani E, Bonchi C, Visaggio D, Facchini M, et al. Role of Iron Uptake Systems in *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Airway Infection. *Infect Immun.* 2016;84: 2324–2335. doi:10.1128/IAI.00098-16
174. Fischbach MA, Lin H, Zhou L, Yu Y, Abergel RJ, Liu DR, et al. The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103: 16502–16507. doi:10.1073/pnas.0604636103
175. Singh V, Yeoh BS, Xiao X, Kumar M, Bachman M, Borregaard N, et al. Interplay between enterobactin, myeloperoxidase and lipocalin 2 regulates *E. coli* survival in the inflamed gut. *Nat Commun.* 2015;6: 7113. doi:10.1038/ncomms8113
176. Russo TA, McFadden CD, Carlino-MacDonald UB, Beanan JM, Barnard TJ, Johnson JR. IroN Functions as a Siderophore Receptor and Is a Urovirulence Factor in an Extraintestinal Pathogenic Isolate of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2002;70: 7156–7160. doi:10.1128/IAI.70.12.7156-7160.2002
177. Nègre VL, Bonacorsi S, Schubert S, Bidet P, Nassif X, Bingen E. The Siderophore Receptor IroN, but Not the High-Pathogenicity Island or the Hemin Receptor ChuA, Contributes to the Bacteremic Step of *Escherichia coli* Neonatal Meningitis. *Infect Immun.* 2004;72: 1216–1220. doi:10.1128/IAI.72.2.1216-1220.2004

178. Feldmann F, Sorsa LJ, Hildinger K, Schubert S. The Salmochelin Siderophore Receptor IroN Contributes to Invasion of Urothelial Cells by Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* *In Vitro*. *Infect Immun*. 2007;75: 3183–3187. doi:10.1128/IAI.00656-06
179. Peigne C, Bidet P, Mahjoub-Messai F, Plainvert C, Barbe V, Médigue C, et al. The Plasmid of *Escherichia coli* Strain S88 (O45:K1:H7) That Causes Neonatal Meningitis Is Closely Related to Avian Pathogenic *E. coli* Plasmids and Is Associated with High-Level Bacteremia in a Neonatal Rat Meningitis Model. *Infect Immun*. 2009;77: 2272–2284. doi:10.1128/IAI.01333-08
180. Hancock V, Ferrières L, Klemm P. The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology*. 2008;154: 167–175. doi:10.1099/mic.0.2007/011981-0
181. Paauw A, Leverstein-van Hall MA, van Kessel KPM, Verhoef J, Fluit AC. Yersiniabactin Reduces the Respiratory Oxidative Stress Response of Innate Immune Cells. *PLoS ONE*. 2009;4. doi:10.1371/journal.pone.0008240
182. Brumbaugh AR, Smith SN, Subashchandrabose S, Himpsl SD, Hazen TH, Rasko DA, et al. Blocking Yersiniabactin Import Attenuates Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Cystitis and Pyelonephritis and Represents a Novel Target To Prevent Urinary Tract Infection. *Infect Immun*. 2015;83: 1443–1450. doi:10.1128/IAI.02904-14
183. Koh E-I, Hung CS, Henderson JP. The Yersiniabactin-Associated ATP Binding Cassette Proteins YbtP and YbtQ Enhance *Escherichia coli* Fitness during High-Titer Cystitis. *Infect Immun*. 2016;84: 1312–1319. doi:10.1128/IAI.01211-15
184. Gao Q, Jia X, Wang X, Xiong L, Gao S, Liu X. The avian pathogenic *Escherichia coli* O2 strain E058 carrying the defined aerobactin-defective iucD or iucDiutA mutation is less virulent in the chicken. *Infect Genet Evol*. 2015;30: 267–277. doi:10.1016/j.meegid.2014.12.038
185. Russo TA, Olson R, MacDonald U, Beanan J, Davidson BA. Aerobactin, but Not Yersiniabactin, Salmochelin, or Enterobactin, Enables the Growth/Survival of Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* *Ex Vivo* and *In Vivo*. *Infect Immun*. 2015;83: 3325–3333. doi:10.1128/IAI.00430-15
186. Valdebenito M, Crumbliss AL, Winkelmann G, Hantke K. Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin, and yersiniabactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Int J Med Microbiol*. 2006;296: 513–520. doi:10.1016/j.ijmm.2006.06.003
187. Hood MI, Skaar EP. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10: 525–537. doi:10.1038/nrmicro2836
188. Krewulak KD, Vogel HJ. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 2008;1778: 1781–1804. doi:10.1016/j.bbamem.2007.07.026
189. Sandy M, Butler A. Microbial Iron Acquisition: Marine and Terrestrial Siderophores. *Chem Rev*. 2009;109: 4580–4595. doi:10.1021/cr9002787
190. Runyen-Janecky LJ. Role and regulation of heme iron acquisition in gram-negative pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3: 55. doi:10.3389/fcimb.2013.00055
191. Hagan EC, Mobley HLT. Heme acquisition is facilitated by a novel receptor Hma and required by uropathogenic *Escherichia coli* for kidney infection. *Mol Microbiol*. 2009;71: 79–

91. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06509.x
192. Caza M, Kronstad J. Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3: 80. doi:10.3389/fcimb.2013.00080
193. Dubois D, Baron O, Cougnoux A, Delmas J, Pradel N, Boury M, et al. ClbP Is a Prototype of a Peptidase Subgroup Involved in Biosynthesis of Nonribosomal Peptides. *J Biol Chem.* 2011;286: 35562–35570. doi:10.1074/jbc.M111.221960
194. Bossuet-Greif N, Dubois D, Petit C, Tronnet S, Martin P, Bonnet R, et al. *Escherichia coli* *ClbS* is a colibactin resistance protein. *Mol Microbiol.* 2016;99: 897–908. doi:10.1111/mmi.13272
195. Brachmann AO, Garcie C, Wu V, Martin P, Ueoka R, Oswald E, et al. Colibactin biosynthesis and biological activity depend on the rare aminomalonyl polyketide precursor. *Chem Commun.* 2015;51: 13138–13141. doi:10.1039/C5CC02718G
196. Li Z-R, Li J, Gu J-P, Lai JYH, Duggan BM, Zhang W-P, et al. Divergent biosynthesis yields a cytotoxic aminomalonate-containing precolibactin. *Nat Chem Biol.* 2016;12: 773–775. doi:10.1038/nchembio.2157
197. Johnson JR, Oswald E, O’Bryan TT, Kuskowski MA, Spanjaard L. Phylogenetic Distribution of Virulence-Associated Genes among *Escherichia coli* Isolates Associated with Neonatal Bacterial Meningitis in The Netherlands. *J Infect Dis.* 2002;185: 774–784. doi:10.1086/339343
198. Putze J, Hennequin C, Nougayrède J-P, Zhang W, Homburg S, Karch H, et al. Genetic Structure and Distribution of the Colibactin Genomic Island among Members of the Family *Enterobacteriaceae*. *Infect Immun.* 2009;77: 4696–4703. doi:10.1128/IAI.00522-09
199. Bondarev V, Richter M, Romano S, Piel J, Schwedt A, Schulz-Vogt HN. The genus *Pseudovibrio* contains metabolically versatile bacteria adapted for symbiosis. *Environ Microbiol.* 2013;15: 2095–2113. doi:10.1111/1462-2920.12123
200. Qin X, Evans JD, Aronstein KA, Murray KD, Weinstock GM. Genome sequences of the honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. *Insect Mol Biol.* 2006;15: 715–718. doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00694.x
201. Dubois D, Delmas J, Cady A, Robin F, Sivignon A, Oswald E, et al. Cyclomodulins in Urosepsis Strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2010;48: 2122–2129. doi:10.1128/JCM.02365-09
202. Krieger JN, Dobrindt U, Riley DE, Oswald E. Acute *Escherichia coli* Prostatitis in Previously Health Young Men: Bacterial Virulence Factors, Antimicrobial Resistance, and Clinical Outcomes. *Urology.* 2011;77: 1420–1425. doi:10.1016/j.urology.2010.12.059
203. Bian X, Fu J, Plaza A, Herrmann J, Pistorius D, Stewart AF, et al. *In Vivo* Evidence for a Prodrug Activation Mechanism during Colibactin Maturation. *ChemBioChem.* 2013;14: 1194–1197. doi:10.1002/cbic.201300208
204. Brotherton CA, Balskus EP. A Prodrug Resistance Mechanism Is Involved in Colibactin Biosynthesis and Cytotoxicity. *J Am Chem Soc.* 2013;135: 3359–3362. doi:10.1021/ja312154m
205. Vizcaino MI, Engel P, Trautman E, Crawford JM. Comparative Metabolomics and Structural Characterizations Illuminate Colibactin Pathway-Dependent Small Molecules. *J Am*

- Chem Soc. 2014;136: 9244–9247. doi:10.1021/ja503450q
206. Li Z-R, Li Y, Lai JYH, Tang J, Wang B, Lu L, et al. Critical Intermediates Reveal New Biosynthetic Events in the Enigmatic Colibactin Pathway. *ChemBioChem*. 2015;16: 1715–1719. doi:10.1002/cbic.201500239
207. Bian X, Plaza A, Zhang Y, Müller R. Two more pieces of the colibactin genotoxin puzzle from *Escherichia coli* show incorporation of an unusual 1-aminocyclopropanecarboxylic acid moiety. *Chem Sci*. 2015;6: 3154–3160. doi:10.1039/C5SC00101C
208. Vizcaino MI, Crawford JM. The colibactin warhead crosslinks DNA. *Nat Chem*. 2015;7: 411–417. doi:10.1038/nchem.2221
209. Healy AR, Vizcaino MI, Crawford JM, Herzon SB. Convergent and Modular Synthesis of Candidate Precolibactins. Structural Revision of Precolibactin A. *J Am Chem Soc*. 2016;138: 5426–5432. doi:10.1021/jacs.6b02276
210. Zha L, Wilson MR, Brotherton CA, Balskus EP. Characterization of Polyketide Synthase Machinery from the *pks* Island Facilitates Isolation of a Candidate Precolibactin. *ACS Chem Biol*. 2016;11: 1287–1295. doi:10.1021/acscchembio.6b00014
211. Mousa JJ, Yang Y, Tomkovich S, Shima A, Newsome RC, Tripathi P, et al. MATE transport of the *E. coli*-derived genotoxin colibactin. *Nat Microbiol*. 2016;1: 15009. doi:10.1038/nmicrobiol.2015.9
212. Kevany BM, Rasko DA, Thomas MG. Characterization of the Complete Zwittermicin A Biosynthesis Gene Cluster from *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75: 1144–1155. doi:10.1128/AEM.02518-08
213. Reimer D, Luxenburger E, Brachmann AO, Bode HB. A New Type of Pyrrolidine Biosynthesis Is Involved in the Late Steps of Xenocoumacin Production in *Xenorhabdus nematophila*. *ChemBioChem*. 2009;10: 1997–2001. doi:10.1002/cbic.200900187
214. Taieb F, Petit C, Nougayrède J-P, Oswald E. The Enterobacterial Genotoxins: Cytolethal Distending Toxin and Colibactin. *EcoSal Plus*. 2016;7. doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0008-2016
215. Homburg S, Oswald E, Hacker J, Dobrindt U. Expression analysis of the colibactin gene cluster coding for a novel polyketide in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;275: 255–262. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00889.x
216. Garcie C, Tronnet S, Garénaux A, McCarthy AJ, Brachmann AO, Pénary M, et al. The Bacterial Stress-Responsive Hsp90 Chaperone (HtpG) Is Required for the Production of the Genotoxin Colibactin and the Siderophore Yersiniabactin in *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 2016;214: 916–924. doi:10.1093/infdis/jiw294
217. Brotherton CA, Wilson M, Byrd G, Balskus EP. Isolation of a Metabolite from the *pks* Island Provides Insights into Colibactin Biosynthesis and Activity. *Org Lett*. 2015;17: 1545–1548. doi:10.1021/acs.orglett.5b00432
218. Tanasova M, Sturla SJ. Chemistry and Biology of Acylfulvenes: Sesquiterpene-Derived Antitumor Agents. *Chem Rev*. 2012;112: 3578–3610. doi:10.1021/cr2001367
219. Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrède J-P. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107: 11537–11542. doi:10.1073/pnas.1001261107

220. Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, Tomkovich S, Uronis JM, Fan T-J, et al. Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota. *Science*. 2012;338: 120–123. doi:10.1126/science.1224820
221. Buc E, Dubois D, Sauvanet P, Raisch J, Delmas J, Darfeuille-Michaud A, et al. High Prevalence of Mucosa-Associated *E. coli* Producing Cyclomodulin and Genotoxin in Colon Cancer. *PLOS ONE*. 2013;8: e56964. doi:10.1371/journal.pone.0056964
222. Raisch J. Colon cancer-associated B2 *Escherichia coli* colonize gut mucosa and promote cell proliferation. *World J Gastroenterol*. 2014;20: 6560. doi:10.3748/wjg.v20.i21.6560
223. Cougnoux A, Dalmaso G, Martinez R, Buc E, Delmas J, Gibold L, et al. Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut*. 2014;63: 1932–1942. doi:10.1136/gutjnl-2013-305257
224. Payros D, Secher T, Boury M, Brehin C, Ménard S, Salvador-Cartier C, et al. Maternally acquired genotoxic *Escherichia coli* alters offspring's intestinal homeostasis. *Gut Microbes*. 2014;5: 313–512. doi:10.4161/gmic.28932
225. Secher T, Samba-Louaka A, Oswald E, Nougayrède J-P. *Escherichia coli* Producing Colibactin Triggers Premature and Transmissible Senescence in Mammalian Cells. *PLOS ONE*. 2013;8: e77157. doi:10.1371/journal.pone.0077157
226. Olier M, Marcq I, Salvador-Cartier C, Secher T, Dobrindt U, Boury M, et al. Genotoxicity of *Escherichia coli* Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. *Gut Microbes*. 2012;3: 501–509. doi:10.4161/gmic.21737
227. Marcq I, Martin P, Payros D, Cuevas-Ramos G, Boury M, Watrin C, et al. The Genotoxin Colibactin Exacerbates Lymphopenia and Decreases Survival Rate in Mice Infected With Septicemic *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 2014;210: 285–294. doi:10.1093/infdis/jiu071
228. McCarthy AJ, Martin P, Cloup E, Stabler RA, Oswald E, Taylor PW. The Genotoxin Colibactin Is a Determinant of Virulence in *Escherichia coli* K1 Experimental Neonatal Systemic Infection. *Infect Immun*. 2015;83: 3704–3711. doi:10.1128/IAI.00716-15
229. Alberts AW, Vagelos PR. Acyl Carrier Protein VIII. STUDIES OF ACYL CARRIER PROTEIN AND COENZYME A IN *ESCHERICHIA COLI* PANTOTHENATE OR β -ALANINE AUXOTROPHS. *J Biol Chem*. 1966;241: 5201–5204.
230. De Lay NR, Cronan JE. A genome rearrangement has orphaned the *Escherichia coli* K-12 AcpT phosphopantetheinyl transferase from its cognate *Escherichia coli* O157:H7 substrates. *Mol Microbiol*. 2006;61: 232–242. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05222.x
231. Grossman TH, Tuckman M, Ellestad S, Osburne MS. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* genes involved in siderophore biosynthesis: relationship between *B. subtilis* *sfpo* and *Escherichia coli* *entD* genes. *J Bacteriol*. 1993;175: 6203–6211.
232. Borchert S, Stachelhaus T, Marahiel MA. Induction of surfactin production in *Bacillus subtilis* by *gsp*, a gene located upstream of the gramicidin S operon in *Bacillus brevis*. *J Bacteriol*. 1994;176: 2458–2462.
233. Barekzi N, Joshi S, Irwin S, Ontl T, Schweizer HP. Genetic characterization of *pcpS*, encoding the multifunctional phosphopantetheinyl transferase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 2004;150: 795–803. doi:10.1099/mic.0.26823-0
234. Chalut C, Botella L, Sousa-D'Auria C de, Houssin C, Guilhot C. The nonredundant roles

of two 4'-phosphopantetheinyl transferases in vital processes of Mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103: 8511–8516. doi:10.1073/pnas.0511129103

235. Chiancone E, Ceci P, Ilari A, Ribacchi F, Stefanini S. Iron and proteins for iron storage and detoxification. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med*. 2004;17: 197–202.

236. Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 2005;12: 1161–1208.

237. Imlay JA. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model *bacterium*. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11: 443–454. doi:10.1038/nrmicro3032

238. Cornelis P, Wei Q, Andrews SC, Vinckx T. Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Met Integr Biometal Sci*. 2011;3: 540–549. doi:10.1039/c1mt00022e

239. Andrews SC. Iron storage in bacteria. *Adv Microb Physiol*. 1998;40: 281–351.

240. Carrondo MA. Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint. *EMBO J*. 2003;22: 1959–1968. doi:10.1093/emboj/cdg215

241. Fillat MF. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch Biochem Biophys*. 2014;546: 41–52. doi:10.1016/j.abb.2014.01.029

242. D'Autréaux B, Pecqueur L, Gonzalez de Peredo A, Diederix REM, Caux-Thang C, Tabet L, et al. Reversible Redox- and Zinc-Dependent Dimerization of the Escherichia coli Fur Protein. *Biochemistry (Mosc)*. 2007;46: 1329–1342. doi:10.1021/bi061636r

243. Pohl E, Haller JC, Mijovilovich A, Meyer-Klaucke W, Garman E, Vasil ML. Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol*. 2003;47: 903–915. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03337.x

244. Lewin AC, Doughty PA, Flegg L, Moore GR, Spiro S. The ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* has no essential cysteine residues and does not contain a structural zinc ion. *Microbiol Read Engl*. 2002;148: 2449–2456. doi:10.1099/00221287-148-8-2449

245. Mills SA, Marletta MA. Metal Binding Characteristics and Role of Iron Oxidation in the Ferric Uptake Regulator from Escherichia coli. *Biochemistry (Mosc)*. 2005;44: 13553–13559. doi:10.1021/bi0507579

246. Deng Z, Wang Q, Liu Z, Zhang M, Machado ACD, Chiu T-P, et al. Mechanistic insights into metal ion activation and operator recognition by the ferric uptake regulator. *Nat Commun*. 2015;6: 7642. doi:10.1038/ncomms8642

247. Lee J-W, Helmann JD. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *BioMetals*. 2007;20: 485. doi:10.1007/s10534-006-9070-7

248. Porcheron G, Dozois CM. Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and RyhB as major regulators of bacterial pathogenicity. *Vet Microbiol*. 2015;179: 2–14. doi:10.1016/j.vetmic.2015.03.024

249. Baichoo N, Helmann JD. Recognition of DNA by Fur: a Reinterpretation of the Fur Box Consensus Sequence. *J Bacteriol*. 2002;184: 5826–5832. doi:10.1128/JB.184.21.5826-5832.2002

250. Seo SW, Kim D, Latif H, O'Brien EJ, Szubin R, Palsson BO. Deciphering Fur transcriptional regulatory network highlights its complex role beyond iron metabolism in *Escherichia coli*. *Nat Commun*. 2014;5: 4910. doi:10.1038/ncomms5910
251. Troxell B, Hassan HM. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3. doi:10.3389/fcimb.2013.00059
252. Massé E, Gottesman S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99: 4620–4625. doi:10.1073/pnas.032066599
253. Nandal A, Huggins CCO, Woodhall MR, McHugh J, Rodríguez-Quiñones F, Quail MA, et al. Induction of the ferritin gene (*ftnA*) of *Escherichia coli* by Fe²⁺–Fur is mediated by reversal of H-NS silencing and is RyhB independent. *Mol Microbiol*. 2010;75: 637–657. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06977.x
254. McHugh JP, Rodríguez-Quiñones F, Abdul-Tehrani H, Svistunenko DA, Poole RK, Cooper CE, et al. Global Iron-dependent Gene Regulation in *Escherichia coli* A NEW MECHANISM FOR IRON HOMEOSTASIS. *J Biol Chem*. 2003;278: 29478–29486. doi:10.1074/jbc.M303381200
255. Ellermeier JR, Slauch JM. Fur Regulates Expression of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Type III Secretion System through HlxD. *J Bacteriol*. 2008;190: 476–486. doi:10.1128/JB.00926-07
256. Sun F, Gao H, Zhang Y, Wang L, Fang N, Tan Y, et al. Fur Is a Repressor of Biofilm Formation in *Yersinia pestis*. *PLOS ONE*. 2012;7: e52392. doi:10.1371/journal.pone.0052392
257. Kim IH, Wen Y, Son J-S, Lee K-H, Kim K-S. The Fur-Iron Complex Modulates Expression of the Quorum-Sensing Master Regulator, SmcR, To Control Expression of Virulence Factors in *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun*. 2013;81: 2888–2898. doi:10.1128/IAI.00375-13
258. Hall HK, Foster JW. The role of fur in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *J Bacteriol*. 1996;178: 5683–5691.
259. Alamuri P, Mehta N, Burk A, Maier RJ. Regulation of the *Helicobacter pylori* Fe-S Cluster Synthesis Protein NifS by Iron, Oxidative Stress Conditions, and Fur. *J Bacteriol*. 2006;188: 5325–5330. doi:10.1128/JB.00104-06
260. Crossley RA, Gaskin DJH, Holmes K, Mulholland F, Wells JM, Kelly DJ, et al. Riboflavin Biosynthesis Is Associated with Assimilatory Ferric Reduction and Iron Acquisition by *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73: 7819–7825. doi:10.1128/AEM.01919-07
261. Bender KS, Yen H-CB, Hemme CL, Yang Z, He Z, He Q, et al. Analysis of a Ferric Uptake Regulator (Fur) Mutant of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73: 5389–5400. doi:10.1128/AEM.00276-07
262. Banin E, Vasil ML, Greenberg EP. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102: 11076–11081. doi:10.1073/pnas.0504266102
263. Oglesby AG, Farrow JM, Lee J-H, Tomaras AP, Greenberg EP, Pesci EC, et al. The Influence of Iron on *Pseudomonas aeruginosa* Physiology A REGULATORY LINK BETWEEN IRON AND QUORUM SENSING. *J Biol Chem*. 2008;283: 15558–15567. doi:10.1074/jbc.M707840200
264. Argaman L, Hershberg R, Vogel J, Bejerano G, Wagner EGH, Margalit H, et al. Novel

- small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr Biol*. 2001;11: 941–950. doi:10.1016/S0960-9822(01)00270-6
265. Wassarman KM, Repoila F, Rosenow C, Storz G, Gottesman S. Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev*. 2001;15: 1637–1651. doi:10.1101/gad.901001
266. Salvail H, Massé E. Regulating iron storage and metabolism with RNA: an overview of posttranscriptional controls of intracellular iron homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2012;3: 26–36. doi:10.1002/wrna.102
267. Gottesman S. Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet*. 2005;21: 399–404. doi:10.1016/j.tig.2005.05.008
268. Oglesby-Sherrouse AG, Murphy ER. Iron-responsive bacterial small RNAs: variations on a theme. *Met Integr Biometal Sci*. 2013;5: 276–286. doi:10.1039/c3mt20224k
269. Tjaden B, Goodwin SS, Opdyke JA, Guillier M, Fu DX, Gottesman S, et al. Target prediction for small, noncoding RNAs in bacteria. *Nucleic Acids Res*. 2006;34: 2791–2802. doi:10.1093/nar/gkl356
270. Waters LS, Storz G. Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell*. 2009;136: 615–628. doi:10.1016/j.cell.2009.01.043
271. Geissmann TA, Touati D. Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J*. 2004;23: 396–405. doi:10.1038/sj.emboj.7600058
272. Franze de Fernandez MT, Eoyang L, August JT. Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA. *Nature*. 1968;219: 588–590.
273. Vogel J, Luisi BF. Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9: 578–589. doi:10.1038/nrmicro2615
274. Lay ND, Schu DJ, Gottesman S. Bacterial Small RNA-based Negative Regulation: Hfq and Its Accomplishes. *J Biol Chem*. 2013;288: 7996–8003. doi:10.1074/jbc.R112.441386
275. Afonyushkin T, Večerek B, Moll I, Bläsi U, Kaberdin VR. Both RNase E and RNase III control the stability of *sodB* mRNA upon translational inhibition by the small regulatory RNA RyhB. *Nucleic Acids Res*. 2005;33: 1678–1689. doi:10.1093/nar/gki313
276. Massé E, Escorcía FE, Gottesman S. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev*. 2003;17: 2374–2383. doi:10.1101/gad.1127103
277. Večerek B, Moll I, Bläsi U. Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *EMBO J*. 2007;26: 965–975. doi:10.1038/sj.emboj.7601553
278. Massé E, Vanderpool CK, Gottesman S. Effect of RyhB Small RNA on Global Iron Use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2005;187: 6962–6971. doi:10.1128/JB.187.20.6962-6971.2005
279. Gottesman S, McCULLEN CA, Guillier M, Vanderpool CK, Majdalani N, Benhammou J, et al. Small RNA Regulators and the Bacterial Response to Stress. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2006;71: 1–11. doi:10.1101/sqb.2006.71.016
280. Wilderman PJ, Sowa NA, FitzGerald DJ, FitzGerald PC, Gottesman S, Ochsner UA, et al. Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved

- in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101: 9792–9797. doi:10.1073/pnas.0403423101
281. Salvail H, Lanthier-Bourbonnais P, Sobota JM, Caza M, Benjamin J-AM, Mendieta MES, et al. A small RNA promotes siderophore production through transcriptional and metabolic remodeling. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107: 15223–15228. doi:10.1073/pnas.1007805107
282. Massé E, Salvail H, Desnoyers G, Arguin M. Small RNAs controlling iron metabolism. *Curr Opin Microbiol*. 2007;10: 140–145. doi:10.1016/j.mib.2007.03.013
283. Prévost K, Salvail H, Desnoyers G, Jacques J-F, Phaneuf É, Massé E. The small RNA RyhB activates the translation of *shiA* mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Mol Microbiol*. 2007;64: 1260–1273. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05733.x
284. Balbontín R, Villagra N, Pardos de la Gándara M, Mora G, Figueroa-Bossi N, Bossi L. Expression of IronN, the salmochelin siderophore receptor, requires mRNA activation by RyhB small RNA homologues. *Mol Microbiol*. 2016;100: 139–155. doi:10.1111/mmi.13307
285. Richards GR, Vanderpool CK. Molecular call and response: The physiology of bacterial small RNAs. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech*. 2011;1809: 525–531. doi:10.1016/j.bbagr.2011.07.013
286. Kim JN. Roles of two RyhB paralogs in the physiology of *Salmonella enterica*. *Microbiol Res*. 2016;186–187: 146–152. doi:10.1016/j.micres.2016.04.004
287. Bos J, Duverger Y, Thouvenot B, Chiaruttini C, Branlant C, Springer M, et al. The sRNA RyhB Regulates the Synthesis of the Escherichia coli Methionine Sulfoxide Reductase MsrB but Not MsrA. *PLOS ONE*. 2013;8: e63647. doi:10.1371/journal.pone.0063647
288. Porcheron G, Habib R, Houle S, Caza M, Lépine F, Daigle F, et al. The Small RNA RyhB Contributes to Siderophore Production and Virulence of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2014;82: 5056–5068. doi:10.1128/IAI.02287-14
289. Oglesby AG, Murphy ER, Iyer VR, Payne SM. Fur regulates acid resistance in *Shigella flexneri* via RyhB and ydeP. *Mol Microbiol*. 2005;58: 1354–1367. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04920.x
290. Murphy ER, Payne SM. RyhB, an Iron-Responsive Small RNA Molecule, Regulates *Shigella dysenteriae* Virulence. *Infect Immun*. 2007;75: 3470–3477. doi:10.1128/IAI.00112-07
291. Africa LAA, Murphy ER, Egan NR, Wigley AF, Wing HJ. The Iron-Responsive Fur/RyhB Regulatory Cascade Modulates the *Shigella* Outer Membrane Protease IcsP. *Infect Immun*. 2011;79: 4543–4549. doi:10.1128/IAI.05340-11
292. Huang S-H, Wang C-K, Peng H-L, Wu C-C, Chen Y-T, Hong Y-M, et al. Role of the small RNA RyhB in the Fur regulon in mediating the capsular polysaccharide biosynthesis and iron acquisition systems in *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Microbiol*. 2012;12: 148. doi:10.1186/1471-2180-12-148
293. Deng Z, Meng X, Su S, Liu Z, Ji X, Zhang Y, et al. Two sRNA RyhB homologs from *Yersinia pestis* biovar microtus expressed in vivo have differential Hfq-dependent stability. *Res Microbiol*. 2012;163: 413–418. doi:10.1016/j.resmic.2012.05.006
294. De Domenico I, McVey Ward D, Kaplan J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9: 72–81.

doi:10.1038/nrm2295

295. Andrews NC. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat Rev Genet.* 2000;1: 208–217. doi:10.1038/35042073
296. Weiss G. Genetic mechanisms and modifying factors in hereditary hemochromatosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7: 50–58. doi:10.1038/nrgastro.2009.201
297. Ganz T. Systemic Iron Homeostasis. *Physiol Rev.* 2013;93: 1721–1741. doi:10.1152/physrev.00008.2013
298. Ganz T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood.* 2011;117: 4425–4433. doi:10.1182/blood-2011-01-258467
299. Andrews NC, Schmidt PJ. Iron Homeostasis. *Annu Rev Physiol.* 2007;69: 69–85. doi:10.1146/annurev.physiol.69.031905.164337
300. Ganz T, Nemeth E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015;15: 500–510. doi:10.1038/nri3863
301. Deschemin J-C, Noordine M-L, Remot A, Willemetz A, Afif C, Canonne-Hergaux F, et al. The microbiota shifts the iron sensing of intestinal cells. *FASEB J.* 2016;30: 252–261. doi:10.1096/fj.15-276840
302. Raymond KN, Dertz EA, Kim SS. Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100: 3584–3588. doi:10.1073/pnas.0630018100
303. Berger T, Togawa A, Duncan GS, Elia AJ, You-Ten A, Wakeham A, et al. Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to *Escherichia coli* infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103: 1834–1839. doi:10.1073/pnas.0510847103
304. Singh V, Yeoh BS, Chassaing B, Zhang B, Saha P, Xiao X, et al. Microbiota-Inducible Innate Immune Siderophore Binding Protein Lipocalin 2 Is Critical for Intestinal Homeostasis. *CMGH Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2016;2: 482–498.e6. doi:10.1016/j.jcmgh.2016.03.007
305. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature.* 2004;432: 917–921. doi:10.1038/nature03104
306. Kanamaru S, Kurazono H, Ishitoya S, Terai A, Habuchi T, Nakano M, et al. Distribution and genetic association of putative uropathogenic virulence factors *iroN*, *iha*, *kpsMT*, *ompT* and *usp* in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Japan. *J Urol.* 2003;170: 2490–2493. doi:10.1097/01.ju.0000094185.48467.dc
307. Vazquez-Gutierrez P, de Wouters T, Werder J, Chassard C, Lacroix C. High Iron-Sequestering Bifidobacteria Inhibit Enteropathogen Growth and Adhesion to Intestinal Epithelial Cells In vitro. *Microb Symbioses.* 2016; 1480. doi:10.3389/fmicb.2016.01480
308. Rebuffat S. Microcins in action: amazing defence strategies of *Enterobacteria*. *Biochem Soc Trans.* 2012;40: 1456–1462. doi:10.1042/BST20120183
309. Micenková L, Bosák J, Štaudová B, Kohoutová D, Čejková D, Woznicová V, et al. Microcin determinants are associated with B2 phylogroup of human fecal *Escherichia coli* isolates. *MicrobiologyOpen.* 2016;5: 490–498. doi:10.1002/mbo3.345
310. Sassone-Corsi M, Nuccio S-P, Liu H, Hernandez D, Vu CT, Takahashi AA, et al. Microcins

- mediate competition among Enterobacteriaceae in the inflamed gut. *Nature*. 2016;advance online publication. doi:10.1038/nature20557
311. Braun V, Pramanik A, Gwinner T, Köberle M, Bohn E. Sideromycins: tools and antibiotics. *BioMetals*. 2009;22: 3. doi:10.1007/s10534-008-9199-7
312. Górska A, Sloderbach A, Marszałł MP. Siderophore–drug complexes: potential medicinal applications of the “Trojan horse” strategy. *Trends Pharmacol Sci*. 2014;35: 442–449. doi:10.1016/j.tips.2014.06.007
313. Mislin GLA, Schalk IJ. Siderophore-dependent iron uptake systems as gates for antibiotic Trojan horse strategies against *Pseudomonas aeruginosa*. *Metallomics*. 2014;6: 408–420. doi:10.1039/C3MT00359K
314. Bailey JK, Pinyon JL, Anantham S, Hall RM. Distribution of Human Commensal *Escherichia coli* Phylogenetic Groups. *J Clin Microbiol*. 2010;48: 3455–3456. doi:10.1128/JCM.00760-10
315. Kortman GAM, Boleij A, Swinkels DW, Tjalsma H. Iron Availability Increases the Pathogenic Potential of *Salmonella Typhimurium* and Other Enteric Pathogens at the Intestinal Epithelial Interface. *PLoS ONE*. 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0029968
316. Nowrouzian FL, Oswald E. *Escherichia coli* strains with the capacity for long-term persistence in the bowel microbiota carry the potentially genotoxic pks island. *Microb Pathog*. 2012;53: 180–182. doi:10.1016/j.micpath.2012.05.011
317. Chen J, Xie J. Role and regulation of bacterial LuxR-like regulators. *J Cell Biochem*. 2011;112: 2694–2702. doi:10.1002/jcb.23219
318. Tronnet S, Garcie C, Rehm N, Dobrindt U, Oswald E, Martin P. Iron homeostasis regulates the genotoxicity of *Escherichia coli* producing colibactin. *Infect Immun*. 2016; doi:10.1128/IAI.00659-16
319. Payne SM, Wyckoff EE, Murphy ER, Oglesby AG, Boulette ML, Davies NML. Iron and Pathogenesis of *Shigella*: Iron Acquisition in the Intracellular Environment. *Biometals*. 2006;19: 173–180. doi:10.1007/s10534-005-4577-x
320. Troxell B, Sikes ML, Fink RC, Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Hassan HM. Fur Negatively Regulates hns and Is Required for the Expression of HlxA and Virulence in *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. *J Bacteriol*. 2011;193: 497–505. doi:10.1128/JB.00942-10
321. Ochsner UA, Johnson Z, Lamont IL, Cunliffe HE, Vasil ML. Exotoxin A production in *Pseudomonas aeruginosa* requires the iron-regulated pvdS gene encoding an alternative sigma factor. *Mol Microbiol*. 1996;21: 1019–1028. doi:10.1046/j.1365-2958.1996.481425.x
322. Jacobsen I, Gerstenberger J, Gruber AD, Bossé JT, Langford PR, Hennig-Pauka I, et al. Deletion of the Ferric Uptake Regulator Fur Impairs the In Vitro Growth and Virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun*. 2005;73: 3740–3744. doi:10.1128/IAI.73.6.3740-3744.2005
323. Tobe T, Yen H, Takahashi H, Kagayama Y, Ogasawara N, Oshima T. Antisense Transcription Regulates the Expression of the Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Virulence Regulatory Gene ler in Response to the Intracellular Iron Concentration. *PLOS ONE*. 2014;9: e101582. doi:10.1371/journal.pone.0101582

324. Holmes K, Mulholland F, Pearson BM, Pin C, McNicholl-Kennedy J, Ketley JM, et al. *Campylobacter jejuni* gene expression in response to iron limitation and the role of Fur. *Microbiology*. 2005;151: 243–257. doi:10.1099/mic.0.27412-0
325. Mey AR, Wyckoff EE, Kanukurthy V, Fisher CR, Payne SM. Iron and Fur Regulation in *Vibrio cholerae* and the Role of Fur in Virulence. *Infect Immun*. 2005;73: 8167–8178. doi:10.1128/IAI.73.12.8167-8178.2005
326. Calderón PF, Morales EH, Acuña LG, Fuentes DN, Gil F, Porwollik S, et al. The small RNA RyhB homologs from *Salmonella typhimurium* participate in the response to S-nitrosoglutathione-induced stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;450: 641–645. doi:10.1016/j.bbrc.2014.06.031
327. Calderón IL, Morales EH, Collao B, Calderón PF, Chahuán CA, Acuña LG, et al. Role of *Salmonella Typhimurium* small RNAs RyhB-1 and RyhB-2 in the oxidative stress response. *Res Microbiol*. 2014;165: 30–40. doi:10.1016/j.resmic.2013.10.008
328. Husain M, Jones-Carson J, Liu L, Song M, Saah JR, Troxell B, et al. Ferric Uptake Regulator-Dependent Antinitrosative Defenses in *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* Pathogenesis. *Infect Immun*. 2014;82: 333–340. doi:10.1128/IAI.01201-13
329. Weigel W a., Demuth D r. QseBC, a two-component bacterial adrenergic receptor and global regulator of virulence in *Enterobacteriaceae* and *Pasteurellaceae*. *Mol Oral Microbiol*. 2016;31: 379–397. doi:10.1111/omi.12138
330. Bunet R, Riclea R, Laureti L, Hôtel L, Paris C, Girardet J-M, et al. A Single Sfp-Type Phosphopantetheinyl Transferase Plays a Major Role in the Biosynthesis of PKS and NRPS Derived Metabolites in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877. *PLOS ONE*. 2014;9: e87607. doi:10.1371/journal.pone.0087607
331. McAllister KA, Peery RB, Meier TI, Fischl AS, Zhao G. Biochemical and Molecular Analyses of the *Streptococcus pneumoniae* Acyl Carrier Protein Synthase, an Enzyme Essential for Fatty Acid Biosynthesis. *J Biol Chem*. 2000;275: 30864–30872. doi:10.1074/jbc.M004475200
332. Flaman AS, Chen JM, Iderstine SCV, Byers DM. Site-directed Mutagenesis of Acyl Carrier Protein (ACP) Reveals Amino Acid Residues Involved in ACP Structure and Acyl-ACP Synthetase Activity. *J Biol Chem*. 2001;276: 35934–35939. doi:10.1074/jbc.M101849200
333. Clardy J, Walsh C. Lessons from natural molecules. *Nature*. 2004;432: 829–837. doi:10.1038/nature03194
334. Schloss PD, Schubert AM, Zackular JP, Iverson KD, Young VB, Petrosino JF. Stabilization of the murine gut microbiome following weaning. *Gut Microbes*. 2012;3: 383–393. doi:10.4161/gmic.21008
335. Laukens D, Brinkman BM, Raes J, De Vos M, Vandenabeele P. Heterogeneity of the gut microbiome in mice: guidelines for optimizing experimental design. *FEMS Microbiol Rev*. 2016;40: 117–132. doi:10.1093/femsre/fuv036
336. Faïs T, Delmas J, Cougnoux A, Dalmaso G, Bonnet R. Targeting colorectal cancer-associated bacteria: A new area of research for personalized treatments. *Gut Microbes*. 2016;7: 329–333. doi:10.1080/19490976.2016.1155020
337. Pramanik A, Braun V. Albomycin Uptake via a Ferric Hydroxamate Transport System of

- Streptococcus pneumoniae R6. J Bacteriol. 2006;188: 3878–3886. doi:10.1128/JB.00205-06
338. Yang Y, Jobin C. Microbial imbalance and intestinal pathologies: connections and contributions. Dis Model Mech. 2014;7: 1131–1142. doi:10.1242/dmm.016428
339. Winter SE, Winter MG, Xavier MN, Thiennimitr P, Poon V, Keestra AM, et al. Host-Derived Nitrate Boosts Growth of *E. coli* in the Inflamed Gut. Science. 2013;339: 708–711. doi:10.1126/science.1232467
340. Lee T, Clavel T, Smirnov K, Schmidt A, Lagkourdos I, Walker A, et al. Oral versus intravenous iron replacement therapy distinctly alters the gut microbiota and metabolome in patients with IBD. Gut. 2016; gutjnl-2015-309940. doi:10.1136/gutjnl-2015-309940
341. Paganini D, Uyoga MA, Zimmermann MB. Iron Fortification of Foods for Infants and Children in Low-Income Countries: Effects on the Gut Microbiome, Gut Inflammation, and Diarrhea. Nutrients. 2016;8: 494. doi:10.3390/nu8080494

ABSTRACT

The intestinal microbiota, *i.e.* the microorganisms present in the intestinal tract, plays a major role in diverse host functions: digestive, metabolic, immune and neurologic. *Escherichia coli* is a normal inhabitant of the commensal intestinal microflora of the human and mammals, and colonizes the gut within few days after birth. *E. coli* can be classified into 7 major phylogenetic groups. The B2 group contains the highest number of strains responsible for chronic (cancers, Crohn's disease, ...) or extra-intestinal infections (neonatal meningitis, septicemia, urinary tract infections, ...). Epidemiologic studies demonstrated that the prevalence of the B2 strains increases in industrialized countries, to the detriment of the ancestral A group. The objective of this study was to determine the factors involved in this evolution.

Genetic analysis showed that strains from the phylogenetic B2 group have high capacities to take up iron through numerous siderophores. Moreover, only B2 strains are able to produce the genotoxin colibactin, which induces double strand breaks DNA in eukaryotic cells, leading to colorectal cancers or to altered development of the intestinal barrier. Siderophores and colibactin belong to the same family of molecules, *i.e.* hybrid polyketide-non ribosomal peptide. Their biosynthesis involves multifunctional enzymes that need to be activated by the covalent binding of a 4'-phosphopantetheinyl moiety. This post-translational modification is catalyzed by 4'-phosphopantetheinyl transferase (PPTase). The PPTase involved in colibactin and in siderophore biosynthesis are ClbA and EntD respectively

Our team has recently demonstrated that ClbA can sustain siderophores biosynthesis, and replaces EntD, highlighting a connexion between multiple pathways and leading to the biosynthesis of distinct secondary metabolites in a given micro-organism.

Because *entD* expression and siderophores synthesis are regulated by iron availability, we hypothesized that ClbA and colibactin are also regulated by iron availability. In this study, we show that transcription of *clbA* and colibactin production decreased in presence of high iron availability, and this regulation occurred through two pathways: dependent and independent on the two major regulators of iron homeostasis, FUR (Ferric Uptake Regulator) and RyhB.

This regulation could allow a fine-tuning production of siderophores and colibactin, and give an advantage in the establishment of intestinal tract colonization.

The potential role of the colibactin in the establishment of intestinal tract colonization by *E. coli* constitutes the second part of my work. Utilization of a murine model that mimics the natural vertical transmission of the microbiota from the mother to her child, suggests that ClbA, and colibactin play a role in intestinal colonization.

In conclusion, we evidenced that *clbA* transcription and colibactin biosynthesis are regulated by iron, and that colibactin could play a role in the establishment of intestinal colonization by *E. coli*. We hypothesized that among factors leading to the increased prevalence of B2 group *E. coli*, dietary iron and the connexion between siderophores and colibactin could be major factors.

AUTEUR :
Directeur/trice(s) de Thèse :
Lieu et Date de soutenance :

Sophie TRONNET
Dr. Patricia MARTIN et Pr. Éric OSWALD
Toulouse, le mardi 10 janvier 2017

TITRE :

**Régulation par le fer et rôle de la colibactine dans la colonisation du tube digestif par
*Escherichia coli***

RÉSUMÉ en français :

Le microbiote intestinal joue un rôle majeur dans le développement des fonctions digestive, métabolique, immunitaire et neurologique de son hôte. *Escherichia coli* est un hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'Homme et des animaux à sang chaud, et s'établit dans le tractus digestif dès les premières heures ou jours qui suivent la naissance. L'espèce *E. coli*, bactérie anaérobie facultative prévalente, peut être divisée en sept groupes phylogénétiques principaux. Le groupe phylogénétique B2 comprend le plus grand nombre de souches responsables d'infections extra-intestinales (méningites néonatales, infections urinaires, septicémies, ...) ou chroniques (cancers, maladie de Crohn, ...). Des études épidémiologiques récentes montrent que le portage de ces souches est en augmentation dans les pays industrialisés, au détriment du groupe ancestral A. L'objectif de mon projet de thèse était de déterminer les facteurs à l'origine de cette évolution.

Une analyse génétique montre que les souches du groupe phylogénétique B2 ont développé une très grande capacité à acquérir le fer, notamment via les sidérophores. Les souches appartenant au groupe B2 sont aussi les seules capables de synthétiser une génotoxine, la colibactine. Celle-ci induit des cassures de l'ADN double brin dans les cellules eucaryotes, pouvant être à l'origine de cancers colorectaux ou d'un défaut de développement de la barrière intestinale. Les sidérophores et la colibactine appartiennent à la même famille de molécules, i.e. des hybrides polycétide-peptide non ribosomiaux. Leur biosynthèse fait intervenir des enzymes multifonctionnelles qui doivent être activées par fixation covalente d'un groupement 4'-phosphopantéthéinyl (P-pant). Cette modification post-traductionnelle est catalysée par la 4'-phosphopantéthéinyl transférase (PPTase). La PPTase ClbA est impliquée dans la synthèse de colibactine. La PPTase impliquée dans celle des sidérophores est EntD.

Récemment, notre équipe a montré que ClbA pouvait participer à la synthèse des sidérophores, et remplacer EntD. Ceci montrait pour la première fois une connexion entre les multiples voies nécessitant des PPTases et conduisant à la biosynthèse de métabolites secondaires fonctionnellement distincts dans un micro-organisme donné.

Dans la mesure où l'expression de *entD* et la synthèse des sidérophores sont régulées par la disponibilité en fer, nous avons fait l'hypothèse que l'expression de *clbA* et la synthèse de la colibactine étaient également régulées par la quantité de fer. Cette étude révèle que la transcription du gène *clbA* et la production de colibactine diminuaient en conditions riches en fer, et que cette régulation se faisait via deux voies : dépendante et indépendante des deux régulateurs majeurs de l'homéostasie du fer chez la bactérie : FUR (Ferric Uptake Regulator), régulateur global de l'homéostasie du fer et RyhB, un petit ARN régulateur. Cette régulation pourrait permettre une production fine des facteurs de virulence que sont les sidérophores et la colibactine, et présenter un avantage dans l'établissement de la colonisation du tractus intestinal.

Le rôle potentiel de la colibactine dans l'établissement de la colonisation intestinale par *E. coli* constitue la seconde partie de mon travail de thèse. L'utilisation d'un modèle murin qui permet de reproduire la transmission naturelle des *E. coli* du microbiote de la mère au nouveau-né, suggère que la colibactine joue un rôle dans la colonisation intestinale.

En conclusion, nous avons mis en évidence que la biosynthèse de la colibactine, et la transcription de *clbA* étaient régulées par le fer, et que la colibactine pourrait favoriser l'établissement de la colonisation intestinale de *E. coli*. Par conséquent, nous faisons l'hypothèse que parmi les facteurs pouvant être à l'origine de l'augmentation de la prévalence des souches du groupe B2 dans les pays industrialisés, le fer alimentaire et l'interaction entre sidérophores et colibactine seraient des facteurs majeurs.

MOTS-CLÉS : *Escherichia coli*, fer, colibactine, RyhB, Fur, microbiote

DISCIPLINE administrative : Microbiologie

INTITULÉ et ADRESSE du LABORATOIRE :

Institut de Recherche en Santé Digestive (INSERM UMR1220 – INRA UMR1416 – ENVT – UT3)
CHU Toulouse Purpan – INSERM Bâtiment B – Place du Docteur Joseph Baylac – CS 60039
31024 Toulouse Cedex 3, France
