



**HAL**  
open science

# Rôle de l'îlot génomique pks dans la synthèse des sidérophores-microcines chez *Escherichia coli*

Clémence Massip

► **To cite this version:**

Clémence Massip. Rôle de l'îlot génomique pks dans la synthèse des sidérophores-microcines chez *Escherichia coli*. Microbiologie et Parasitologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2019. Français. NNT : 2019TOU30163 . tel-02736911

**HAL Id: tel-02736911**

**<https://theses.hal.science/tel-02736911>**

Submitted on 2 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# 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  
**Clémence MASSIP**

Le 13 mai 2019

**Rôle de l'îlot génomique *pks* dans la synthèse des  
sidérophores-microcines chez *Escherichia coli***

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **MICROBIOLOGIE**

Unité de recherche :  
**IRSD - Institut de Recherche en Santé Digestive**

Thèse dirigée par  
**Eric OSWALD**

Jury

**M. Stéphane BONACORSI**, Rapporteur  
**Mme Isabelle SCHALK**, Rapporteur  
**M. Erick DENAMUR**, Rapporteur  
**Mme Christine ROQUES-CESCHIN**, Examinatrice  
**M. Eric OSWALD**, Directeur de thèse

# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement,

Monsieur le Professeur Stéphane Bonacorsi, Monsieur le Professeur Erick Denamur et Madame le Docteur Isabelle Schalk de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs.

Madame le Professeur Christine Roques-Ceschin d'avoir accepté de juger ce travail et présider notre jury. Merci de ta disponibilité et de tes conseils amicaux.

Monsieur le Professeur Eric Oswald pour m'avoir accueillie comme Assistante et Doctorante dans son équipe. Merci de m'avoir confié ce sujet, une « histoire facile pour me faire la main avec *Escherichia coli* » au final beaucoup plus riche et passionnant que nous ne l'escomptions vous et moi, et plein de perspectives d'avenir.

Je tiens à remercier toute l'équipe « Pathogénie et commensalisme des entérobactéries », sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

En particulier Jean-Phi et Priscilla avec qui les échanges sont toujours très riches et sources de progrès, Patricia pour tes conseils précieux en bio mol, Michèle mon ange gardien des débuts, Nadège et Déborah pour leur expertise technique, Camille pour ton sérieux et surtout ton enthousiasme, j'espère que nous partagerons bien d'autres projets.

Mais aussi Claude, Christine, Marie, Nicolas, Min pour votre aide, votre bonne humeur et nos échanges.

Je remercie également toute l'équipe du laboratoire de Bactériologie de m'avoir accueillie et intégrée. Merci de votre professionnalisme et de votre enthousiasme pour notre discipline.

Merci enfin à tous ceux qui comptent pour moi. Vous vous reconnaitrez ...



*Les dieux avaient condamné Sisyphe à rouler sans cesse un rocher jusqu'au sommet d'une montagne d'où la pierre retombait par son propre poids. Ils avaient pensé avec quelque raison qu'il n'est pas de punition plus terrible que le travail inutile et sans espoir. (...) Si la descente ainsi se fait certains jours dans la douleur, elle peut se faire aussi dans la joie. Ce mot n'est pas de trop. (...) Toute la joie silencieuse de Sisyphe est là. Son destin lui appartient. Son rocher est sa chose. (...) La lutte elle-même vers les sommets suffit à remplir un coeur d'homme. Il faut imaginer Sisyphe heureux.*

Albert Camus  
Le mythe de Sisyphe

# TABLE DES MATIERES

Table des illustrations .....	8
Table des abréviations.....	10
Introduction.....	12

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

<b><i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 .....</b>	<b>17</b>
I. Les origines de <i>E. coli</i> Nissle 1917.....	17
1. Une légende dorée .....	17
2. ... remise en question, mais la rigueur scientifique demeure.....	18
II. Applications thérapeutiques de <i>E. coli</i> Nissle 1917.....	19
1. Dans les dysfonctionnements intestinaux.....	19
a. Dans le traitement des diarrhées chez le jeune enfant .....	19
b. Dans le traitement de la constipation chronique .....	20
c. Dans le traitement du syndrome de l'intestin irritable.....	21
2. Dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.....	21
a. Bactéries et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin .....	21
b. Intérêt de <i>E. coli</i> Nissle contre la maladie de Crohn .....	23
c. Impact de <i>E. coli</i> Nissle contre la rectocolite hémorragique.....	24
3. Possibles applications futures.....	24
III. Déterminants de l'effet probiotique de <i>E. coli</i> Nissle .....	26
1. Innocuité .....	26
2. Grande capacité d'adhésion .....	27
3. Propriétés immunomodulatrices .....	29
a. Stimulation de l'immunité intestinale .....	29
b. Effets anti-inflammatoires.....	30

4.	Production de quatre types de sidérophores .....	32
a.	Généralités sur la synthèse des composés PK et NRP .....	33
b.	Synthèse et export des sidérophores de <i>E. coli</i> Nissle .....	36
c.	Recapture des sidérophores .....	38
d.	Rôles des sidérophores dans la colonisation et la virulence .....	40
IV.	Comparaison avec les souches phylogénétiquement proches ABU83972 et CFT073 .....	42
1.	Un lien de parenté avec les souches ABU83972 et CFT073 .....	43
2.	<i>E. coli</i> Nissle, un pathogène « déconstruit » .....	45
	<b>Les sidérophores-microcines .....</b>	<b>47</b>
I.	Classification et nomenclature .....	47
II.	Systèmes génétiques .....	49
1.	Une organisation générale conservée .....	49
2.	Des îlots sidérophores-microcines .....	52
III.	Des gènes à la structure : biosynthèse et régulation .....	54
1.	Synthèse des sidérophores-microcines .....	54
2.	Régulation de la biosynthèse des sidérophores-microcines .....	57
IV.	Mécanismes d'action .....	59
1.	Capture par la bactérie cible .....	60
2.	Cibles cellulaires .....	62
3.	L'énigme <i>E. coli</i> Nissle .....	65
	<b>L'îlot <i>pks</i> .....</b>	<b>66</b>
I.	Généralités .....	66
1.	Le système génétique de l'îlot <i>pks</i> .....	66
2.	Distribution de l'îlot <i>pks</i> .....	67
II.	Synthèse de la colibactine .....	68
III.	Impacts de la colibactine .....	71
1.	Relation structure-activité .....	71
2.	Phénotypes associés .....	73

3.	Conséquences en santé humaine .....	74
a.	Colibactine et cancer .....	74
b.	Îlot <i>pks</i> et virulence.....	75
IV.	Autres rôles de l'îlot <i>pks</i> .....	76
1.	La PPTase ClbA et la production de sidérophores .....	76
2.	Production d'un métabolite analgésique .....	77
3.	Synthèse de molécules antibiotiques.....	78

## **RESULTATS EXPERIMENTAUX**

<b>Article 1 : Relation entre îlots sidérophores-microcines et <i>pks</i> chez <i>E. coli</i> Nissle</b> .....	<b>81</b>
---	-----------

<b>Article 2 : L'association synergique îlot sidérophores-microcines, îlot <i>pks</i> et locus <i>iroA</i>, un facteur de colonisation urinaire de <i>E. coli</i></b> .....	<b>127</b>
---	------------

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

<b>La triade îlot microcines tronqué - îlot <i>pks</i> - locus <i>iroA</i>, un facteur de polyvalence des souches du phylogroupe B2</b> .....	<b>142</b>
---	------------

<b>Microcines et souches probiotiques : des alternatives aux traitements antibiotiques classiques ?</b> .....	<b>146</b>
---	------------

<b>Perspectives</b> .....	<b>149</b>
---------------------------	------------

<b>Conclusion générale</b> .....	<b>155</b>
----------------------------------	------------

<b>Liste des publications et présentations</b> .....	<b>158</b>
--	------------

<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>160</b>
--	------------



# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## FIGURES

<u>Figure 1</u> : La dualité propriétés probiotiques / facteurs de virulence chez <i>E. coli</i> Nissle .....	13
<u>Figure 2</u> : Principales étapes de la genèse du probiotique <i>E. coli</i> Nissle : de la « recherche clinique avant la lettre » .....	18
<u>Figure 3</u> : Le microbiote, le terrain génétique de l'hôte et des facteurs environnementaux contribuent à la pathogénèse des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. ....	22
<u>Figure 4</u> : Applications thérapeutiques de <i>E. coli</i> Nissle actuelles et envisagées .....	25
<u>Figure 5</u> : Structures à la surface de <i>E. coli</i> Nissle impliquées dans l'adhésion.....	27
<u>Figure 6</u> : Propriétés immunomodulatrices de <i>E. coli</i> Nissle .....	31
<u>Figure 7</u> : Structure des quatre sidérophores produits par <i>E. coli</i> Nissle. ....	33
<u>Figure 8</u> : Domaines essentiels des modules de PKS et de NRPS. ....	34
<u>Figure 9</u> : Activité des domaines AT des PKS et A des NRPS. ....	35
<u>Figure 10</u> : Activités des domaines KS des PKS et C des NRPS. ....	35
<u>Figure 11</u> : Principales étapes de la captation du fer par les sidérophores.....	36
<u>Figure 12</u> : « Clusters » de gènes permettant la production des quatre sidérophores de <i>E. coli</i> Nissle.....	37
<u>Figure 13</u> : Import des quatre types de sidérophores complexés au fer chez <i>E. coli</i> Nissle.....	39
<u>Figure 14</u> : Carte schématique du génome de <i>E. coli</i> Nissle. ....	44
<u>Figure 15</u> : Organisation des « clusters » de gènes permettant la synthèse des sidérophores-microcines. ....	51
<u>Figure 16</u> : Comparaison des fragments d'ADN contenant le système génétique de production de la microcine H47.....	53
<u>Figure 17</u> : Structure de la sidérophore-microcine E492.....	55

<u>Figure 18</u> : Schéma général de la synthèse et de l'export de la sidérophore-microcine E492 par <i>K. pneumoniae</i> RYC492. ....	56
<u>Figure 19</u> : Production de microcine E492 inactive par des bactéries portant des mutations dans les gènes de synthèse de l'entérobactine. ....	61
<u>Figure 20</u> : Mode d'action de la microcine E492. ....	63
<u>Figure 21</u> : L'îlot <i>pks</i> .....	67
<u>Figure 22</u> : Modèle de biosynthèse de la précolibactine .....	69
<u>Figure 23</u> : Protection de la souche productrice de colibactine contre l'auto-toxicité	70
<u>Figure 24</u> : Modèle de précolibactine supposé.....	72
<u>Figure 25</u> : Effet cytopathique de la colibactine : la mégaloctose.....	73
<u>Figure 26</u> : Carte schématique du chromosome d'une souche de <i>E. coli</i> portant l'îlot <i>pks</i> .....	77
<u>Figure 27</u> : Physiopathologie des infections urinaires .....	129
<u>Figure 28</u> : Facteurs de virulence produits par les îlots <i>pks</i> , <i>iroA</i> et sidérophores-microcines .....	142
<u>Figure 29</u> : Courbes de croissance de la souche LF82 en contact avec des surnageants de culture de <i>E. coli</i> Nissle .....	150
<u>Figure 30</u> : ClbP, un cofacteur de MchEF pour l'export des sidérophores-microcines chez <i>E. coli</i> Nissle .....	151
<u>Figure 31</u> : Effet anti-staphylococcique de <i>E. coli</i> Nissle dépendant de l'îlot <i>pks</i> mais pas des sidérophores-microcines.....	152

## TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> : Résistances aux antibiotiques de <i>E. coli</i> Nissle. ....	26
<u>Tableau 2</u> : Caractéristiques générales des dix microcines connues. ....	48

## TABLE DES ABREVIATIONS

ABC	« ATP binding-cassette »
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Adénosine monophosphate
AIEC	Souche de <i>Escherichia coli</i> adhérente-invasive
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
CNF-1	Cytotoxic necrotizing factor 1
DHBS	2,3-dihydroxybenzoyl sérine
domaine A	Domaine d'adénylation
domaine AT	Domaine acyltransférase
domaine C	Domaine de condensation
domaine KS	Domaine kétosynthase
domaine T	Domaine de thiolation
EHEC	Souche de <i>Escherichia coli</i> entéro-hémorragique
ExPEC	Souche de <i>Escherichia coli</i> pathogène extra-intestinale
Fur	« Ferric uptake regulation »
HPI	« High pathogenicity-island »
Ig	Immunoglobulines
IL	Interleukine
kb	Kilobase
kDa	Kilodaltons
M	mol / L ; molaire
MAP	« Mitogen-activated protein »
MATE	« Multidrug and toxic compound extrusion »
Mb	Millions de paires de bases
MFP	« Membrane fusion protein »
MFS	« Major facilitator superfamily »
MICI	Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
NRP	Peptides non-ribosomiques
NRPS	NRP synthase

OMV	Vésicules de la membrane externe (« outer membrane vesicles »)
PK	Polycétides
PKS	PK synthase
PPTases	Phosphopantéthéinyl transférases
RCH	Rectocolite hémorragique
SASP	« Senescent associated secretory profile »
Sat	Secreted autotransporter toxin
SII	Syndrome de l'intestin irritable
ST	« Sequence type »
TLR	Toll-like receptors
UFC	Unités formant colonies
UPEC	« Uropathogenic <i>E. coli</i> », souche de <i>E. coli</i> uropathogène

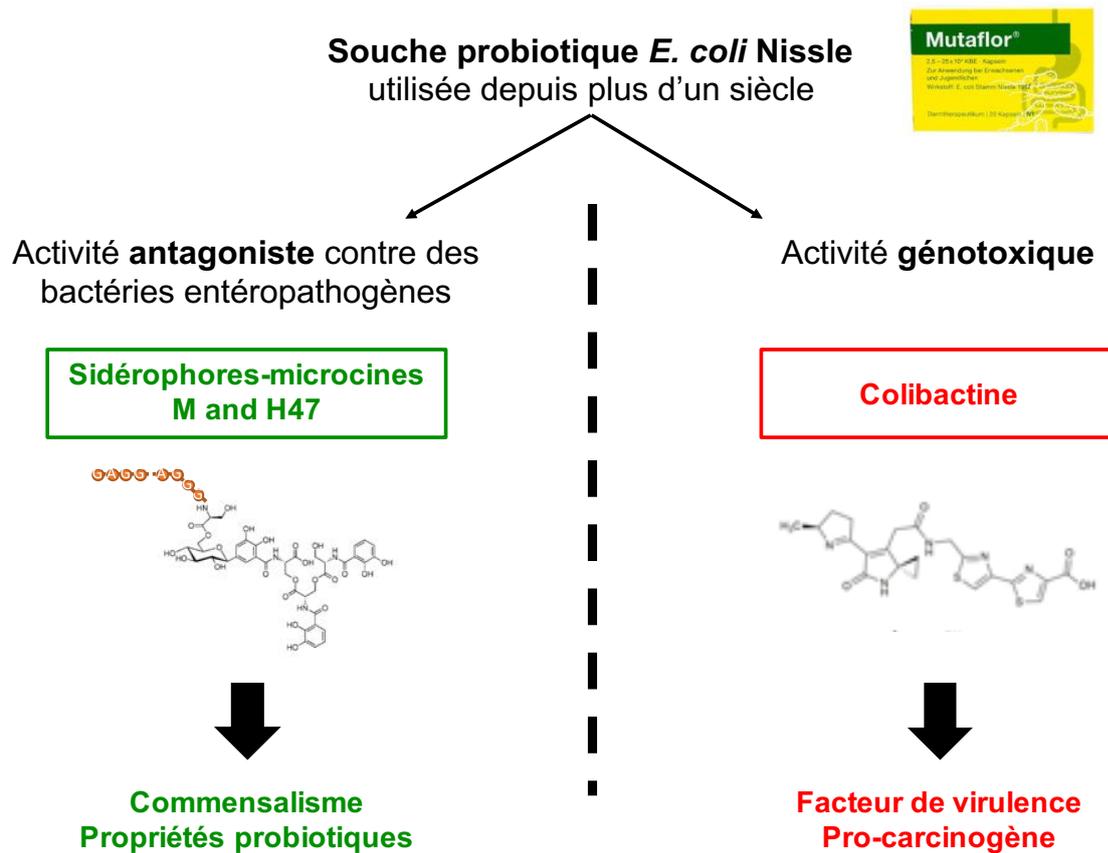
## Introduction

*Escherichia coli* est la bactérie anaérobie facultative la plus abondante du microbiote intestinal humain. Elle colonise le tractus gastro-intestinal du nourrisson dans les heures qui suivent la naissance et établit une relation symbiotique durable (1).

*E. coli* est également un agent pathogène humain de premier plan. Certaines souches sont responsables d'atteintes intestinales, comme les souches *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC) ou entéro-toxinogènes. Les souches *E. coli* pathogènes extra-intestinales (ExPEC) sont capables de sortir de la niche intestinale et de se propager dans l'organisme. Elles sont alors responsables de péritonites, d'abcès, de méningites, de septicémies et plus fréquemment d'infections urinaires (1,2).

Face à une telle variabilité, la question des facteurs à l'origine des propriétés commensales ou pathogènes d'une souche de *E. coli* a fait l'objet de nombreuses recherches. L'analyse du « core genome » a révélé la présence de sept groupes phylogénétiques : A, B1, B2, C, D, E et F (3,4). La distribution des facteurs de virulence varie selon les phylogroupes. Ainsi, les ExPEC appartiennent principalement au phylogroupe B2 et renferment davantage de facteurs de virulence (5,6). Cependant, dans les pays industrialisés, le phylogroupe B2 englobe également la majorité des souches commensales digestives (7). La dichotomie pathogénicité / commensalisme chez *E. coli* ne peut donc se résumer au seul phylogroupe.

Le problème de la distinction pathogénicité / commensalisme se complexifie encore en prenant le cas de la souche probiotique *E. coli* Nissle, pourtant administrée pour ses propriétés thérapeutiques depuis plus d'un siècle (8). Elle produit des peptides antimicrobiens, les sidérophores-microcines qui exercent une activité antagoniste contre des bactéries entéropathogènes comme *Salmonella* (9,10). Cependant, *E. coli* Nissle appartient au phylogroupe B2 et synthétise des facteurs de virulence, tels que la colibactine (11) (**Figure 1**). La production de cette génotoxine à la structure encore imparfaitement élucidée est codée par l'îlot génomique *pks*. Outre son rôle comme facteur de virulence (12,13), la colibactine possède également une activité pro-carcinogène (14,15).



**Figure 1** : La dualité propriétés probiotiques / facteurs de virulence chez *E. coli* Nissle

A l'origine de ce travail était donc l'ambition de s'affranchir de la pathogénicité potentielle de *E. coli* Nissle liée à la colibactine, tout en conservant ses propriétés probiotiques (**Figure 1**). Néanmoins, l'emploi de divers mutants de l'îlot *pks* a révélé que les systèmes de production des sidérophores-microcines et de la colibactine sont liés. Par conséquent, virulence et commensalisme chez *E. coli* sont encore plus intriqués que nous ne l'avions envisagé. Ces résultats seront présentés sous la forme d'un article (**Article 1**).

Dans un second temps, la prévalence de la synergie entre îlot *pks* et sidérophores-microcines a été établie parmi des souches cliniques de *E. coli* isolées de prélèvements urinaires. La corrélation de cette association avec la gravité clinique de l'infection a été étudiée (**Article 2**). Ces différents résultats seront ensuite discutés.

Préalablement à la présentation des travaux expérimentaux, une synthèse bibliographique sera consacrée à *E. coli* Nissle, aux sidérophores-microcines et à l'îlot *pks*.



# **SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**



# ***Escherichia coli* Nissle 1917**

## **I. Les origines de *E. coli* Nissle 1917**

### **1. Une légende dorée ...**

La souche *E. coli* Nissle 1917 doit son nom au Dr Alfred Nissle, médecin et bactériologiste à l'Institut d'Hygiène de l'Université de Fribourg-en-Brisgau (16). Nissle s'est plus particulièrement intéressé à la capacité de certaines souches de *E. coli* issues de selles d'individus sains à inhiber la croissance de souches entéropathogènes telles que des souches de *Salmonella*. Il a nommé cette propriété « activité antagoniste » et développé des tests en milieux liquides et solides permettant de mettre en évidence les souches à « activité antagoniste forte » (16,17). Ses recherches s'attachaient davantage à découvrir des applications médicales dans le traitement des pathologies gastro-intestinales qu'à élucider les mécanismes bactériologiques ou biochimiques de cette activité (16).

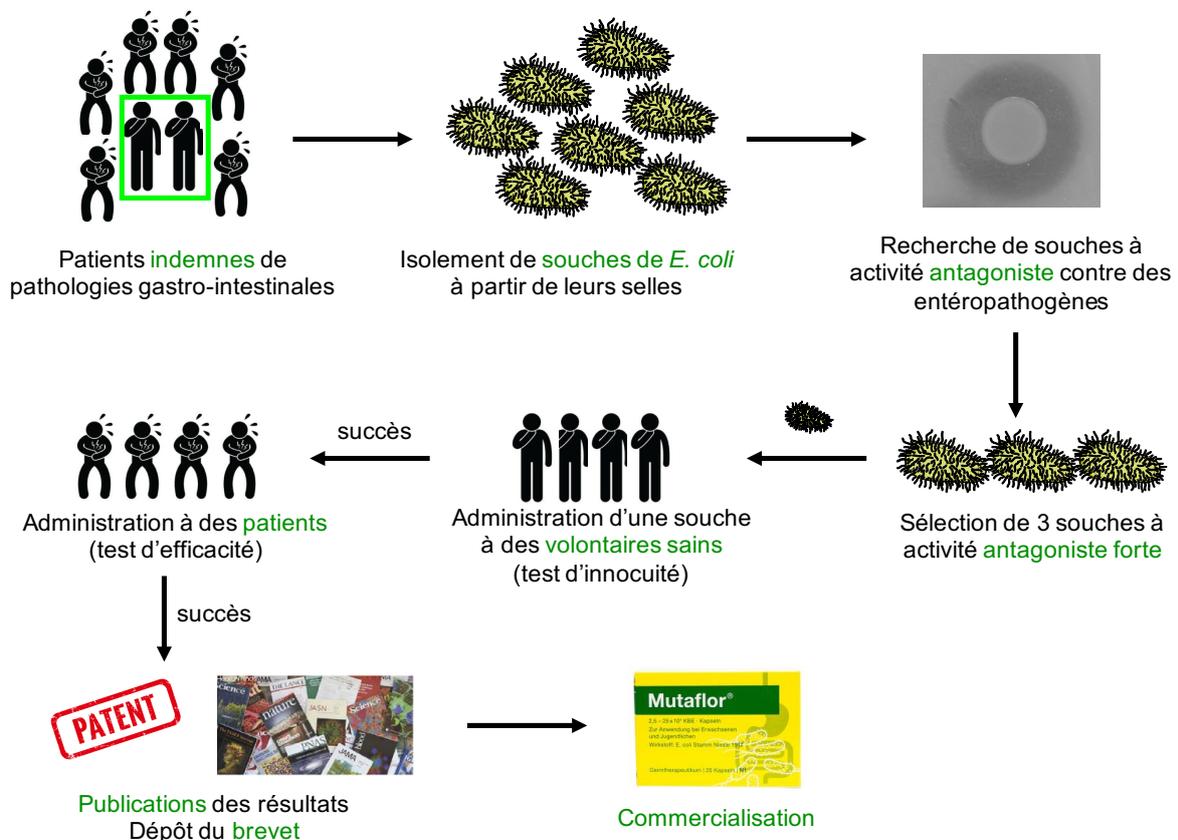
Dans cette optique, pendant la Première Guerre Mondiale, Nissle a étudié le cas d'un soldat allemand demeuré asymptomatique alors que ses camarades de régiment subissaient des épidémies de diarrhées (18–20). Certains auteurs rapportent qu'il s'agirait d'épidémies de shigelloses sur le front des Balkans (8,16). Nissle a isolé des selles de ce patient une souche de *E. coli* à activité antagoniste forte contre différentes souches entéropathogènes, ce qui expliquerait la résistance particulière de ce soldat. Cette souche sera ensuite nommée *E. coli* Nissle 1917 (8,16,17).

Pour tester l'intérêt thérapeutique de cette souche dans le traitement des infections intestinales, Nissle a fabriqué des capsules à partir de sub-cultures de *E. coli* Nissle 1917 (16,17). Il les a tout d'abord administrées à des volontaires sains pour en vérifier l'innocuité, puis à des patients symptomatiques (17). Après une série de succès thérapeutiques publiés en 1916, Nissle a obtenu un brevet en 1917 pour commercialiser cette souche sous le nom Mutaflor<sup>®</sup>, formé à partir du latin « mutare », changer et « flora » pour refléter sa capacité à modifier le microbiote intestinal (16). Cette spécialité est aujourd'hui produite par la société Ardeypharm.

## 2. ... remise en question, mais la rigueur scientifique demeure

Alfred Nissle a publié de nombreux travaux jusqu'à son décès en 1965. Cependant, tous ces travaux sont en langue allemande, moins communément comprise que l'anglais, et ne sont pas aisément accessibles par les moteurs de recherche bibliographiques courants de type Pubmed (Medline). D'ailleurs, il est fréquent que les auteurs mentionnant en une phrase l'historique de la souche ne citent pas de référence bibliographique (18,20,21). Cela a conduit Trudy Wassenaar dans une revue de 2016 à questionner la réalité de la consultation et de la compréhension des écrits de Nissle par certains auteurs, et de là, à douter de la véracité du récit communément admis (17). L'auteur, germanophone, a réussi à accéder à cinq publications originales de Nissle.

Alfred Nissle y présente les expériences lui permettant d'évaluer l'effet antagoniste. Il décrit trois souches à activité antagoniste très forte, dont deux isolées de soldats en 1915. Nissle sélectionnait spécifiquement les patients qui n'avaient jamais présenté de pathologie entérique, bien qu'ils aient été exposés à des patients infectés.



**Figure 2** : Principales étapes de la genèse du probiotique *E. coli* Nissle : de la « recherche clinique avant la lettre »

Après deux ans de subcultures, seul moyen dont il disposait pour conserver ses souches, Nissle rapporte qu'une des trois souches a perdu son activité antagoniste. La souche *E. coli* Nissle 1917 est une des deux souches restantes sur lesquelles Nissle a poursuivi ses investigations (17).

Dans les publications auxquelles Wassenaar a pu accéder, Nissle ne décrit pas si la souche finale est issue d'un des soldats, ni sur quels fronts les soldats avaient combattu, ni même si ces soldats hospitalisés en Allemagne étaient allemands. Le nombre « 1917 » ne correspond d'ailleurs pas à l'année d'isolement de la souche (1915), ni à la date de première publication (1916) (17). Il peut correspondre à l'année de dépôt du brevet (16).

Si avec Wassenaar, nous pouvons douter de la véracité historique de ces faits, il convient de signaler qu'il ne s'agit que de détails qui sont probablement venus enjoliver la « légende » de la souche *E. coli* Nissle 1917. L'auteur de la revue insiste au final sur la qualité, la rigueur et l'aspect précurseur des recherches d'Alfred Nissle qui a réalisé de véritables « recherches cliniques avant la lettre » (17) (**Figure 2**).

## **II. Applications thérapeutiques de *E. coli* Nissle 1917**

### **1. Dans les dysfonctionnements intestinaux**

#### **a. Dans le traitement des diarrhées chez le jeune enfant**

Comme rapporté dans notre première partie consacrée à l'historique de *E. coli* Nissle, cette souche a été étudiée et utilisée initialement pour sa capacité à protéger des diarrhées infectieuses (16,17). En effet, il a été montré que *E. coli* Nissle inhibe l'invasion de cellules épithéliales intestinales par *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri* ou *Salmonella enterica* Typhimurium (22). Dans un modèle murin, *E. coli* Nissle limite la colonisation intestinale par *S. enterica* Typhimurium (23).

Par ailleurs, deux études réalisant des co-cultures entre cette souche et des souches EHEC de sérotypes O157:H7 et O104:H4 montre que Nissle limite leur croissance et la synthèse de Shiga-toxines (24,25). *E. coli* Nissle réduit également la cytotoxicité de ces souches EHEC envers des cellules Véro (25). Les antibiotiques n'étant généralement pas indiqués dans le traitement des diarrhées infectieuses non

compliquées (salmonelloses, shigelloses ou yersinioses), ni *a fortiori* des infections à EHEC de peur de stimuler la production de Shiga-toxines, l'usage de *E. coli* Nissle pourrait être une alternative intéressante. Cependant, aucune étude clinique en ce sens n'a encore été publiée.

Les seules études cliniques concernant le rôle thérapeutique de *E. coli* Nissle contre les diarrhées ont été réalisées chez des enfants de moins de 4 ans. Dans ces deux études concernant les diarrhées aiguës (durant moins de 3 jours) (26) et les diarrhées plus prolongées (d'une durée supérieure à 4 jours mais inférieure à 2 semaines) (27), l'administration de *E. coli* Nissle réduisait significativement la durée des symptômes en comparaison à un placebo. Il est à noter que seule une minorité d'enfants souffraient de diarrhées d'origine bactérienne. Les étiologies étaient le plus souvent virales (20 à 30% des patients) ou indéterminées (50 à 60% des patients).

L'action « anti-diarrhéique » de *E. coli* Nissle ne se limite donc pas à une action purement antibactérienne. Ainsi, *E. coli* Nissle a un rôle protecteur vis-à-vis du rotavirus humain dans un modèle de porcs gnotobiotiques, notamment en stimulant l'immunité cellulaire (cellules dendritiques plasmacytoïdes et natural killers) (28). De plus, cette souche préserve l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale dans un modèle murin de colite provoquée par du dextran sulfate de sodium en induisant l'expression des jonctions serrées (29)

#### **b. Dans le traitement de la constipation chronique**

A l'opposé du spectre des dysfonctionnements intestinaux, quelques études se sont penchées sur l'intérêt de l'administration de *E. coli* Nissle dans la constipation chronique. Deux études cliniques allemandes résumées dans une revue de Sonnenborn U. et Schulze J. (8) ont comparé l'efficacité de *E. coli* Nissle à un placebo ou au traitement de référence par du lactulose. *E. coli* Nissle améliorait significativement l'évacuation des selles quel que soit le comparateur, tout en occasionnant moins d'effets secondaires (flatulences et crampes abdominales) que le lactulose. Une étude exposant du tissu musculaire lisse de colon humain à des surnageants de cultures de *E. coli* Nissle a démontré que cette souche stimule les cellules musculaires lisses et augmente ainsi la contractilité du colon par l'intermédiaire de différents métabolites, dont l'acide acétique (30).

### **c. Dans le traitement du syndrome de l'intestin irritable**

Le syndrome de l'intestin irritable (SII) est le trouble fonctionnel intestinal le plus fréquent (prévalence d'environ 10%). Il se traduit par des épisodes associant douleurs abdominales et troubles du transit (diarrhées ou constipation). C'est une affection multifactorielle dont la physiopathologie n'est pas élucidée. Le SII associe des troubles de la motricité intestinale et une hypersensibilité viscérale. Or les bactéries intestinales notamment par la production de gaz et d'acides gras à courtes chaînes modulent la motricité digestive. Elles peuvent provoquer une hypersensibilité en interagissant avec les cellules épithéliales et immunitaires intestinales. Un rôle d'altérations du microbiote intestinal dans le SII est donc de plus en plus envisagé (31).

Dans ce contexte, deux études cliniques ont évalué l'effet de l'administration de *E. coli* Nissle *versus* placebo dans la symptomatologie de 120 (32) et 139 patients (33) souffrant du SII. Aucune de ces études ne parvient à démontrer une supériorité significative de *E. coli* Nissle. Les auteurs mettent en avant la très grande hétérogénéité des patients recrutés et la nécessité de distinguer des sous-groupes pour des études ultérieures : selon la symptomatologie (prédominance de diarrhées, de constipation ou symptomatologie mixte), selon le contexte de survenue du SII (post-antibiotiques, post-gastroentérite). En effet, certains sous-groupes montrent des résultats encourageants : *E. coli* Nissle semble bénéfique chez les patients diarrhéiques (33) et les patients pour qui le SII s'est déclenché suite à la prise d'antibiotiques ou suite à une gastro-entérite (32).

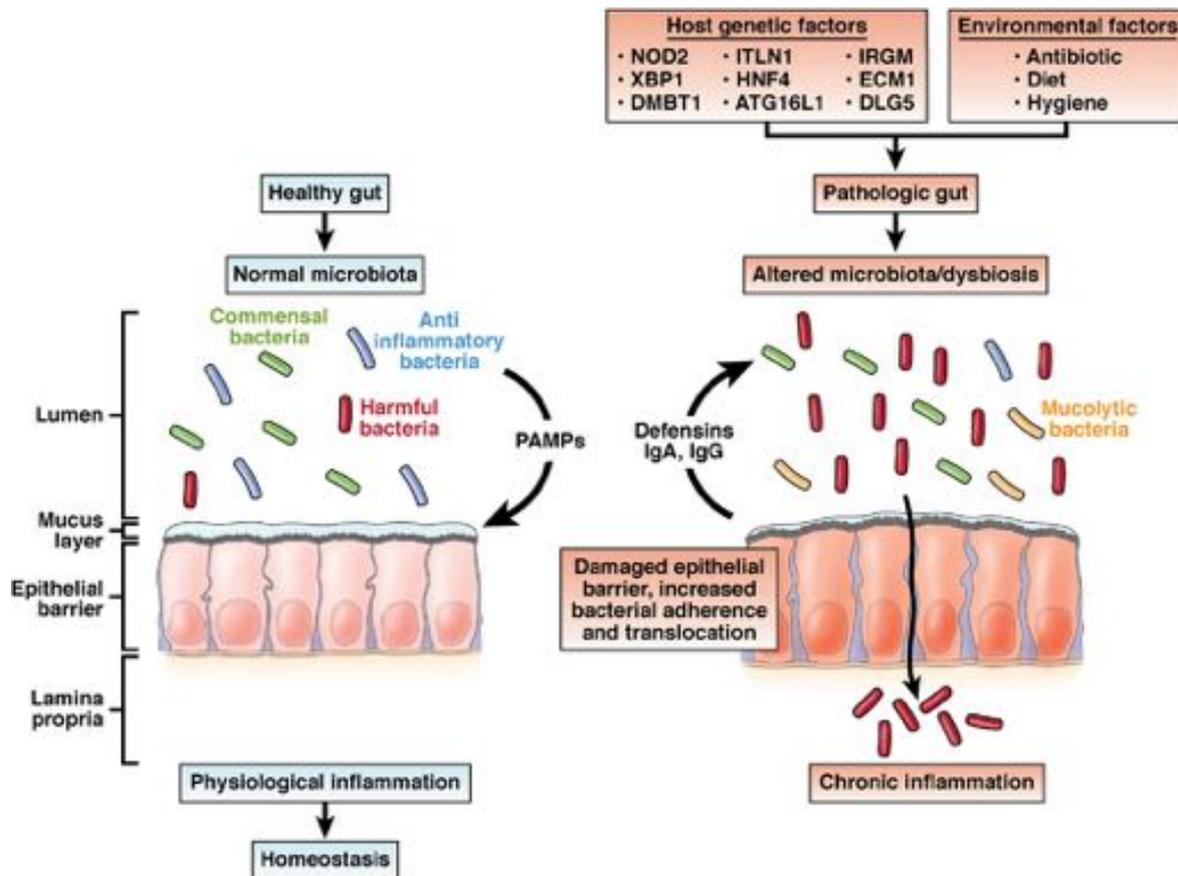
L'efficacité clinique de *E. coli* Nissle contre des dysfonctionnements intestinaux variés (diarrhées, constipation) n'impliquant pas uniquement des bactéries a conduit à envisager son utilisation dans la prise en charge des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

## **2. Dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin**

### **a. Bactéries et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin**

Les deux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) les plus fréquentes sont la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (RCH). Alors que la RCH se traduit par une inflammation et des lésions continues superficielles de la

muqueuse colique, la maladie de Crohn peut affecter toute l'épaisseur de la paroi intestinale. Bien que la maladie de Crohn puisse toucher de façon discontinue n'importe quelle portion du tractus digestif, les portions les plus fréquemment atteintes sont la partie terminale de l'iléon et le caecum. Dans ces zones, de même que dans le rectum, site privilégié des lésions de RCH, la concentration bactérienne est particulièrement élevée (34).



**Figure 3 : Le microbiote, le terrain génétique de l'hôte et des facteurs environnementaux contribuent à la pathogénèse des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.**

A gauche. Chez les individus sains, les bactéries commensales anti-inflammatoires interagissent avec la muqueuse gastro-intestinale pour maintenir l'homéostasie. Le microbiote limite les effets pro-inflammatoires des bactéries agressives et maintient la tolérance immunitaire.

A droite. Chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, l'homéostasie est perturbée par des interactions anormales entre les cellules de l'hôte et les micro-organismes, ce qui conduit à une inflammation intestinale. Cette inflammation pourrait être liée à des facteurs génétiques de l'hôte qui perturbent la barrière intestinale, l'immunité innée et adaptative ainsi qu'à des changements dans la composition du microbiote. D'après Chassaing B. *et al.* (35)

La physiopathologie des MICI n'est pas élucidée mais l'hypothèse communément admise est qu'un terrain génétique prédisposerait à une rupture de l'homéostasie intestinale vers une réponse inflammatoire inadaptée. L'altération du microbiote intestinal ou dysbiose est un facteur majeur dans le déclenchement et l'amplification de ce processus (34,35) (**Figure 3**).

Une moindre diversité du microbiote des patients atteints de MICI a été observée. De plus, les bactéries aux propriétés anti-inflammatoires telles que certains *Bacteroides* sont moins abondantes (**Figure 3**). A l'inverse, les entérobactéries et principalement *E. coli* sont en quantités plus importantes que chez les sujets sains (35).

Un sous-groupe de *E. coli*, les souches de *E. coli* adhérentes-invasives (AIEC) a été désigné comme particulièrement impliqué dans la genèse de la maladie de Crohn. En effet, les AIEC sont anormalement prédominantes dans les lésions des patients atteints (36). De plus, la souche AIEC LF82 isolée d'une biopsie d'un patient atteint de maladie de Crohn (37) induit la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et bloque le cycle cellulaire des cellules épithéliales coliques (38).

#### **b. Intérêt de *E. coli* Nissle contre la maladie de Crohn**

Comme les bactéries aux propriétés pro-inflammatoires et plus particulièrement les AIEC ont un rôle dans le développement de la maladie de Crohn, l'utilisation de probiotiques a été envisagée pour tenter de les éradiquer et de les remplacer. *In vitro*, *E. coli* Nissle réduit l'invasion de cellules épithéliales intestinales humaines par LF82 (21,39) et limite la production de cytokines pro-inflammatoires (39).

Si les résultats *in vitro* de l'utilisation de *E. coli* Nissle contre LF82 semblent prometteurs, les résultats cliniques restent décevants. Une revue Cochrane a montré l'absence de bénéfice de l'administration des probiotiques en général, et de *E. coli* Nissle en particulier, dans la prévention des rechutes de la maladie de Crohn (40). Cependant, les auteurs de cette revue signalent le faible nombre d'études (cinq pour l'ensemble des probiotiques testés) et la faiblesse des effectifs (75 patients pour la plus grande cohorte). En particulier, l'efficacité de *E. coli* Nissle n'a été testée que dans une seule étude comportant 28 patients (40,41). Davantage d'études cliniques sont donc nécessaires pour pouvoir trancher sur l'intérêt de l'administration de *E. coli* Nissle dans la prise en charge de la maladie de Crohn.

### **c. Impact de *E. coli* Nissle contre la rectocolite hémorragique**

Les résultats des études cliniques concernant l'administration de *E. coli* Nissle dans la prise en charge de la RCH sont plus positifs que pour la maladie de Crohn. Ces six études ont été évaluées dans une méta-analyse (42).

Dans quatre études, l'efficacité de *E. coli* Nissle a été comparée au traitement de référence par mésalazine dans le maintien de la rémission. Une étude s'intéresse à une population pédiatrique. Dans toutes ces études, *E. coli* Nissle est équivalent à la mésalazine dans la prévention des rechutes avec des effets secondaires comparables (42). Ce probiotique pourrait donc constituer une option thérapeutique intéressante.

Les résultats des trois études s'intéressant à la capacité de *E. coli* Nissle à induire une rémission sont plus contrastés et ne permettent pas de recommander son utilisation (42). En effet, son efficacité est comparable au placebo dans deux études, à la mésalazine dans une étude. Les auteurs de la méta-analyse signalent l'insuffisance du nombre d'études pour adopter une conclusion définitive et suggèrent qu'il pourrait être intéressant d'évaluer *E. coli* Nissle comme traitement adjuvant lors de l'induction de la rémission (42).

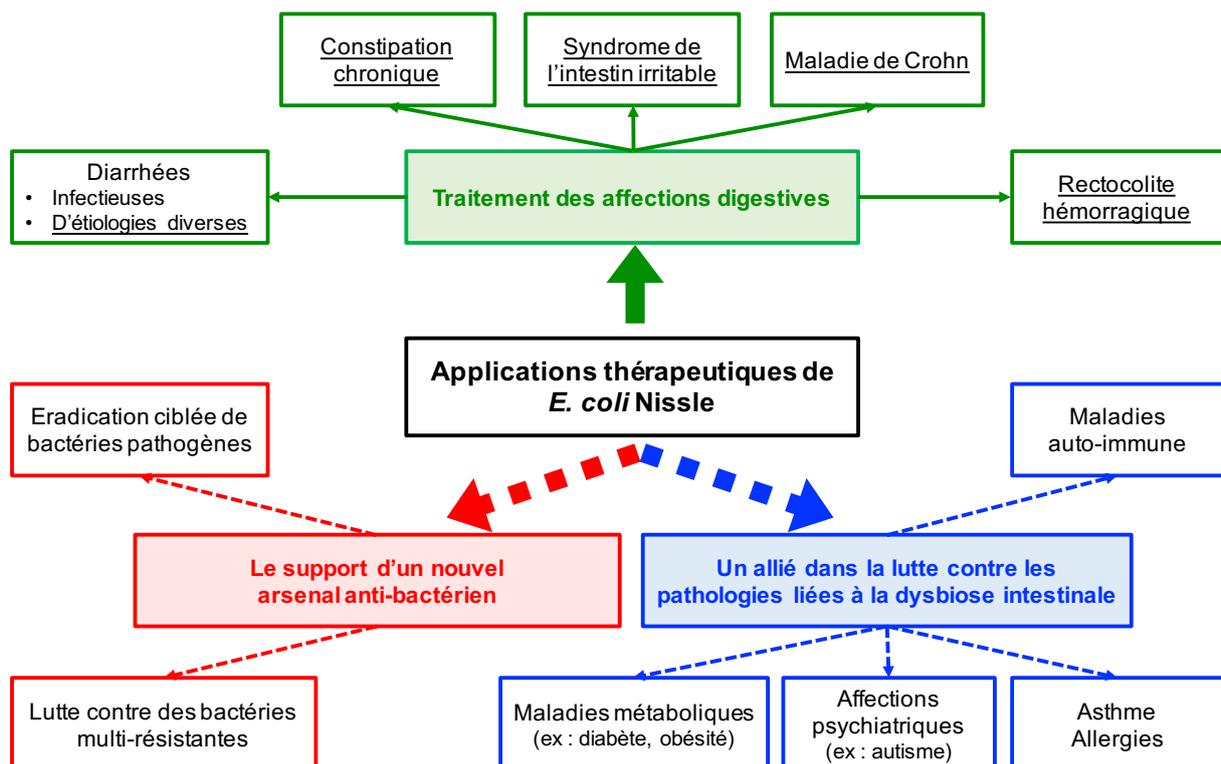
### **3. Possibles applications futures**

Les applications thérapeutiques de *E. coli* Nissle ayant déjà fait l'objet d'études cliniques concernent toutes des pathologies intestinales. Cependant, un rôle du microbiote intestinal est désormais suspecté dans de nombreuses pathologies n'affectant pas directement le tube digestif : l'obésité, l'asthme, l'autisme, le diabète de type 2, les maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde ou la sclérose en plaques, etc (43). Il est donc très probable que des études à venir se penchent sur un effet bénéfique éventuel de *E. coli* Nissle dans ces pathologies.

Un autre domaine d'application futur de *E. coli* Nissle est la lutte contre les infections bactériennes. En effet, l'émergence des bactéries multi-résistantes en raison du mésusage des antibiotiques a été décrite par l'Organisation Mondiale de la Santé comme une menace importante à la santé mondiale (44). Face à l'absence de nouvelle classe d'antibiotiques, en particulier dirigée contre les bactéries à Gram négatif, l'Organisation Mondiale de la Santé a décrété que le développement de nouveaux

antibiotiques contre les bactéries à Gram négatif était une priorité absolue (44). Dans ce contexte, diverses équipes ont modifié *E. coli* Nissle pour sécréter des peptides antimicrobiens et ainsi accroître leur effet antagoniste contre des bactéries spécifiques dans des modèles animaux. Ainsi des souches modifiées de *E. coli* Nissle ont été développées pour lutter contre des bactéries potentiellement pathogènes et éviter ainsi l'usage d'antibiotiques « conventionnels » à plus large spectre (*Salmonella enterica* (45), *Pseudomonas aeruginosa* (46)). D'autres ont été créées pour éradiquer le portage de bactéries hautement résistantes posant actuellement des problèmes d'impasses thérapeutiques (47).

Si *E. coli* Nissle est utilisé en thérapeutique depuis plus d'un siècle, elle a pourtant fait l'objet de peu d'études cliniques. Les principales applications thérapeutiques actuelles et envisagées sont résumées dans la **Figure 4**.



**Figure 4 : Applications thérapeutiques de *E. coli* Nissle actuelles et envisagées**

L'efficacité clinique de *E. coli* Nissle a été évaluée dans le traitement de diverses affections digestives (cadres verts). Les applications ayant fait l'objet d'études cliniques sont soulignées. A l'avenir, *E. coli* Nissle pourrait être utilisé comme nouvelle arme antibiotique (cadres rouges) ou dans la lutte contre les affections liées à un déséquilibre du microbiote intestinal (cadres bleus)

### III. Déterminants de l'effet probiotique de *E. coli* Nissle

Dans cette partie concernant les déterminants de l'activité probiotique de *E. coli* Nissle, nous n'évoquerons pas la colibactine synthétisée par l'îlot *pks*, ni les sidérophores-microcines. Elles feront l'objet de parties distinctes.

#### 1. Innocuité

Les probiotiques sont habituellement définis comme des « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, confèrent à l'hôte un bénéfice pour sa santé » (48). Un prérequis essentiel pour une utilisation comme probiotique est donc l'innocuité de *E. coli* Nissle, avant toute mention d'effet bénéfique. L'analyse du génome (49), puis le séquençage complet (20) ont révélé que *E. coli* Nissle ne produit pas de toxines (hémolysines ou shiga-like toxines par exemple). Cette souche ne présente pas de résistances aux antibiotiques autres que les résistances naturelles des bacilles à Gram négatif anaérobie facultatifs (**Tableau 1**) (8).

**Tableau 1 : Résistances aux antibiotiques de *E. coli* Nissle.**

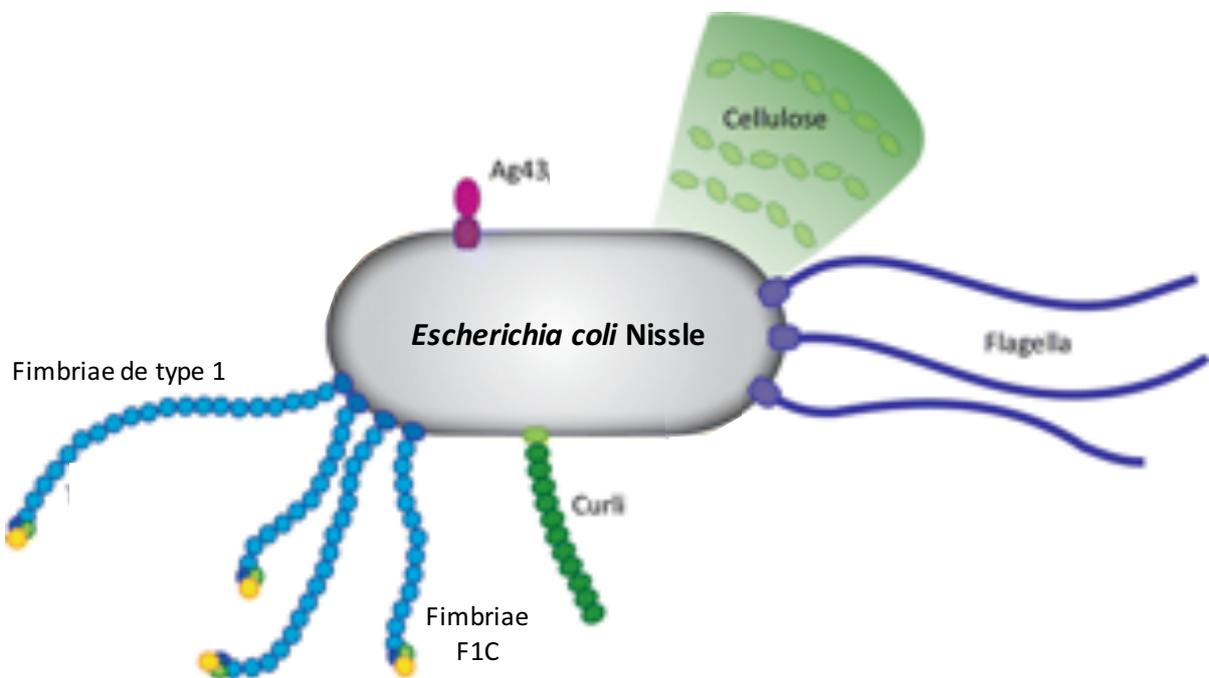
Modifié d'après Sonnenborn U. et Schulze J. (8)

Familles d'antibiotiques	Molécules
Beta-lactamines	Pénicilline G Cefsulodine
Glycopeptides et lipopeptides	Vancomycine, téicoplanine Daptomycine
Macrolides et apparentés	Erythromycine Clindamycine Pristinamycine
Nitro-imidazolés	Métronidazole
Oxazolidinone	Linézolide
Rifamycines	Rifampicine

*E. coli* Nissle porte deux plasmides non transférables (3,2 et 5,5 paires de bases) qui ne codent aucun facteur de virulence ou de résistance aux antibiotiques connus (50).

## 2. Grande capacité d'adhésion

Dans différents modèles animaux (souris, rats, porcelets), *E. coli* Nissle est capable de coloniser l'intestin (8,51,52). En effet, il a été montré *in vitro* que *E. coli* Nissle adhère aux cellules épithéliales intestinales (21,52,53). Par ailleurs, sur des surfaces inertes, *E. coli* Nissle forme du biofilm (8,51,54) plus efficacement que des souches pathogènes (entéropathogènes, entérotoxinogènes) et de façon comparable à des souches de *E. coli* commensales (54). Cette capacité de colonisation et de formation de biofilm s'explique par la présence chez *E. coli* Nissle de structures impliquées dans l'adhésion : des fimbriae (fimbriae de type 1, fimbriae F1C, curli), l'antigène 43, des flagelles et la capacité de produire de la cellulose (**Figure 5**) (49).



**Figure 5** : Structures à la surface de *E. coli* Nissle impliquées dans l'adhésion.

Modifié d'après Klemm P. *et al.* (55)

Une souche de *E. coli* capable de produire des fimbriae de type 1 en porte entre 100 et 500 de façon péritriche. Il s'agit d'organelles tubulaires mesurant jusqu'à 2  $\mu\text{m}$  de long et particulièrement flexibles ce qui leur permet de s'adapter aux forces de cisaillement. L'adhésine FimH présente à leur extrémité se lie avec différents dérivés du mannose ainsi qu'avec des protéines comme la laminine, le collagène et la fibronectine. Ces organelles permettent donc aux bactéries de se lier à de nombreuses

cellules eucaryotes différentes (56). En particulier, les fimbriae de type 1 jouent un rôle dans l'adhésion de *E. coli* Nissle à certaines cellules épithéliales (51).

La structure des fimbriae F1C est comparable à celle des fimbriae de type 1. Ils sont particulièrement exprimés par les souches urinaires de *E. coli* (14 à 30% des souches). D'ailleurs, l'adhésine FocH située à leur extrémité se lie avec les galatosylcéramides et globotriaosylcéramides présents en particulier sur les cellules épithéliales de l'arbre urinaire (56). Les fimbriae F1C sont nécessaires à l'adhésion de *E. coli* Nissle à des surfaces inertes et à des membranes cellulaires. Ils favorisent la persistance intestinale de *E. coli* Nissle dans un modèle de colonisation orale de souris (51).

Les flagelles de *E. coli* Nissle sont également des facteurs de colonisation (53). *E. coli* Nissle possède des flagelles de sérotype H1 qui lui permettent un mouvement actif, notamment au sein du mucus intestinal visqueux (8). Au-delà de cette mobilité active vers les cellules hôtes qui est un prérequis à l'adhésion, les flagelles de *E. coli* Nissle agissent directement comme des adhésines. Elles interagissent en effet avec le mucus colique humain, probablement en se liant au gluconate (53).

Les curli sont des organelles de structure plus simple : ils sont formés par auto-assemblage d'un seul type de sous-unité protéique à l'extérieur de la bactérie. Ils se lient à de nombreuses protéines humaines (ex : laminine, fibronectine, plasminogène). Ils sont également suspectés de participer à la formation de biofilm.

Outre les organelles de surface, *E. coli* Nissle porte également l'antigène 43, une protéine de la membrane externe qui permet des interactions bactéries-bactéries au sein des biofilms.

Enfin, l'adhésion de *E. coli* Nissle fait intervenir la synthèse de cellulose. En effet, un mutant incapable de synthétiser de la cellulose montre une moindre adhérence aux cellules épithéliales *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin (52).

*E. coli* Nissle possède donc de nombreux facteurs d'adhésion, dont certains ont été étudiés spécifiquement dans cette souche. Cependant, les mécanismes précis d'adhésion de *E. coli* Nissle sont encore largement méconnus.

### 3. Propriétés immunomodulatrices

#### a. Stimulation de l'immunité intestinale

L'épithélium intestinal produit des peptides antimicrobiens pour renforcer sa fonction de barrière entre l'organisme et le milieu extérieur. Les défensines constituent une famille importante de ces peptides antimicrobiens. Elles ont un spectre d'activité large contre de nombreuses bactéries, virus et champignons (57). La synthèse d'un de ces peptides, la  $\beta$ -2 défensine est induite par la flagelline de *E. coli* Nissle, constituant principal des flagelles (58).

Par ailleurs, dans un modèle porcin, l'administration orale de *E. coli* Nissle augmente la concentration intestinale de calprotectine. Ce peptide antimicrobien produit majoritairement par les polynucléaires neutrophiles limite l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales de la muqueuse, principalement par compétition pour l'absorption de zinc et de calcium (59).

Ainsi, *E. coli* Nissle exerce un effet antagoniste indirect vis-à-vis d'autres micro-organismes de la niche en agissant sur l'immunité innée intestinale par induction de la synthèse de peptides antimicrobiens.

De plus, *E. coli* Nissle induit l'expression des Toll-like récepteurs (TLR) 4 et 5 par les cellules épithéliales intestinales (60). Les TLR sont des composants clés de l'immunité innée car ils reconnaissent divers composants microbiens. Pour les bactéries à Gram-négatif, les TLR4 sont classiquement décrits comme des récepteurs du lipopolysaccharide et les TLR5 des récepteurs de la flagelline. En stimulant la production de ces TLR, *E. coli* Nissle permet une meilleure réactivité du système immunitaire local contre d'autres micro-organismes. Il a été montré que la capsule de sérotype K5 de *E. coli* Nissle stimule à elle seule l'expression des TLR5.

D'une façon générale, la capsule est décrite comme un facteur de virulence, car elle protège la bactérie contre des systèmes de défense non spécifiques (ex : la phagocytose), ce qui allonge sa durée de survie dans le compartiment sanguin. *E. coli* Nissle produit une capsule K5, sérotype présent chez seulement 1% des souches de *E. coli*, mais sur-représenté parmi les souches uropathogènes. Cependant, *E. coli* Nissle est rapidement détruite lorsqu'elle est mise en contact de sérum humain. Par conséquent, sa capsule qui n'entraîne pas de résistance au sérum ne peut pas être considérée comme un réel facteur de virulence (8).

La capsule de *E. coli* Nissle est également un déterminant important de l'induction de la synthèse de certaines cytokines pro-inflammatoires, comme la « monocyte chemoattractant protein 1 » (MCP-1), les « macrophage inflammatory protein »  $2\alpha$  (MIP- $2\alpha$ ) et MIP- $2\beta$  et l'interleukine (IL) 8 par l'activation de la voie des « mitogen-activated protein » (MAP) kinases (60,61). Les cytokines IL-8 et MCP-1 permettent le recrutement des cellules de l'immunité comme les polynucléaires neutrophiles et les monocytes dans l'épithélium. Ces derniers peuvent donc rapidement phagocyter d'éventuels micro-organismes pathogènes attaquant l'épithélium.

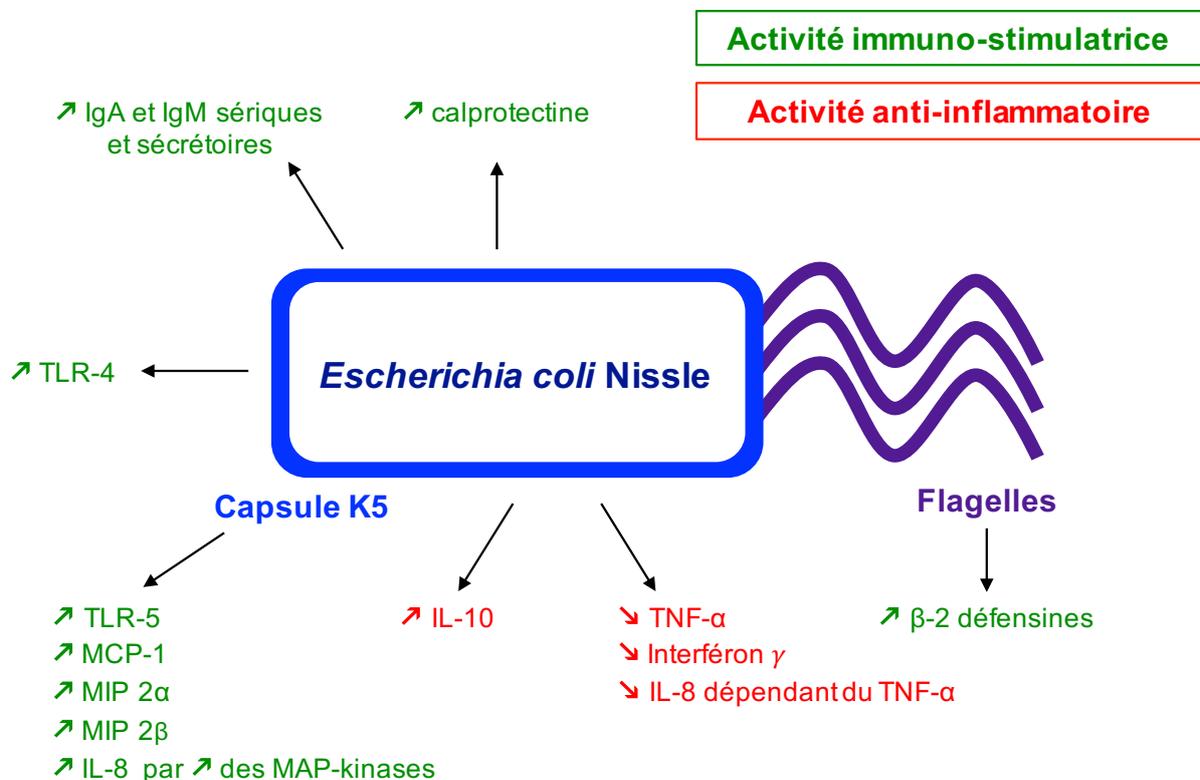
Outre cette stimulation de l'immunité innée au niveau de la barrière intestinale, *E. coli* Nissle exerce également une action inductrice sur l'immunité humorale. En effet, l'administration orale de *E. coli* Nissle à des nouveaux-nés prématurés ou nés à terme augmente les concentrations sériques d'immunoglobulines (Ig) A et M mais pas celle des IgG. Les niveaux d'IgA et d'IgM sécrétoires dans les filtres de selles sont également augmentés (8).

En résumé, *E. coli* Nissle stimule l'immunité innée et humorale intestinales, ce qui explique partiellement ses effets thérapeutiques contre les diarrhées infectieuses : l'épithélium intestinal exposé à *E. coli* Nissle semble mieux préparé à affronter des micro-organismes pathogènes.

#### **b. Effets anti-inflammatoires**

Une étude utilisant des lignées cellulaires de lymphocytes T a montré que *E. coli* Nissle diminue la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-2, « tumor necrosis factor » (TNF)  $\alpha$ , et interféron  $\gamma$ . En parallèle, cette souche induit la synthèse de l'IL-10, une cytokine immunomodulatrice aux propriétés bénéfiques contre l'inflammation muqueuse (62). Par ailleurs, *E. coli* Nissle inhibe la production d'IL-8 stimulée par le TNF- $\alpha$  (voie différente de la voie des MAP-kinases évoquée au paragraphe précédent). Ainsi *E. coli* Nissle exerce une action anti-inflammatoire qui explique, au moins partiellement son effet bénéfique dans les MICI. Le rôle des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et interféron  $\gamma$  a d'ailleurs été décrit comme crucial dans la genèse de ces pathologies (62).

Il est à noter que, dans un modèle murin de colite provoquée par du dextran sulfate de sodium, les propriétés anti-inflammatoires ont été décrites comme similaires que *E. coli* Nissle soit administré par voie orale sous forme de bactéries entières ou seulement sous forme de vésicules de la membrane externe (« outer membrane vesicles » OMV) (63). Ces vésicules produites par les bactéries à Gram négatif renferment de nombreux constituants bactériens, parmi lesquels de l'acide désoxyribonucléique (ADN), du peptidoglycane et du lipopolysaccharide. Ce sont donc des moyens importants de communication entre bactéries et cellules eucaryotes qui font l'objet d'un nombre croissant d'études, notamment comme outils thérapeutiques et vaccinaux car à la différence des bactéries entières, ils ne peuvent pas se multiplier.



**Figure 6 : Propriétés immunomodulatrices de *E. coli* Nissle**

Modifié d'après Jacobi C. et Malfertheiner P. (57)

Au total, les effets anti-inflammatoires démontrés *in vitro* corroborent les effets bénéfiques de *E. coli* Nissle dans les MICI par exemple. Cependant, cette bactérie semble exercer à la fois des effets anti-inflammatoires et immuno-stimulateurs (décrits au paragraphe précédent) (**Figure 6**). Une réponse à cet apparent paradoxe serait que les cellules hôtes répondent différemment aux stimuli de *E. coli* Nissle en fonction de leur type cellulaire et de leur localisation. Ainsi, *E. coli* Nissle limite la prolifération

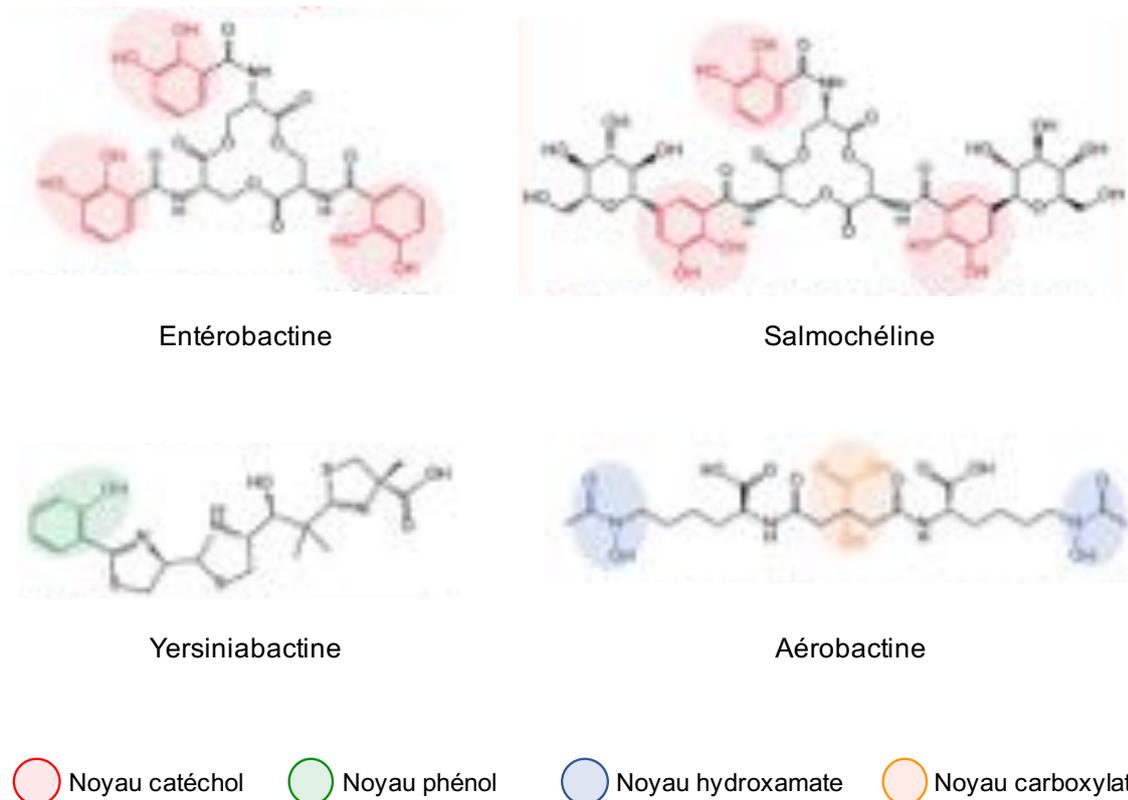
des lymphocytes T naïfs et mémoire circulants mais n'a pas d'activité inhibitrice vis-à-vis des lymphocytes T de la *lamina propria* (62). Ce probiotique inhibe ainsi probablement le recrutement des lymphocytes T circulants vers la muqueuse intestinale, en accord avec son effet anti-inflammatoire bénéfique, sans déstabiliser les défenses muqueuses (ex : les lymphocytes T de la *lamina propria*). *E. coli* Nissle contribue ainsi au maintien de l'homéostasie immunologique de l'intestin (62).

#### 4. Production de quatre types de sidérophores

A quelques exceptions près, le fer est un élément indispensable pour la vie. En présence d'oxygène, le fer est sous forme ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) très insoluble dans l'eau ( $10^{-18}$  mol / L (M) à pH7). De plus, chez l'hôte, la majorité du fer est complexé à des protéines (ex : hémoglobine, ferritine), ce qui abaisse ainsi chez l'homme la concentration en fer dans le sérum à  $10^{-24}$  M. Pour atteindre la concentration cytosolique d'environ  $10^{-6}$  M nécessaire à leur croissance, les bactéries utilisent des systèmes de chélation du fer. Ainsi, elles synthétisent des sidérophores, molécules présentant une affinité telle pour le fer ferrique qu'elles peuvent récupérer le fer lié aux protéines de l'hôte (64).

*E. coli* Nissle produit quatre types de sidérophores différents : l'entérobactine, les salmochélines, l'aérobactine et la yersiniabactine (49). L'entérobactine, composé de type peptide non-ribosomique (NRP) de la famille des catécholates est le sidérophore le plus couramment produit par les entérobactéries (**Figure 7**). Les salmochélines sont des dérivés glycosylés de l'entérobactine. La yersiniabactine est un composé hybride polycétides-peptides non-ribosomiques (PK-NRP) de la famille des phénols et l'aérobactine un sidérophore non-PK et non-NRP de type citrate-hydroxamate (65).

Avant de nous intéresser plus précisément à la synthèse et aux rôles de ces sidérophores de *E. coli* Nissle, nous débuterons par quelques généralités sur la synthèse des composés de type PK, NRP et PK-NRP.



**Figure 7 : Structure des quatre sidérophores produits par *E. coli* Nissle.**

Quatre groupements permettent aux sidérophores de fixer le fer : les noyaux catéchol (rouge), phénol (vert), hydroxamate (bleu) et carboxylate (orange). D'après Wilson B. *et al.* (66)

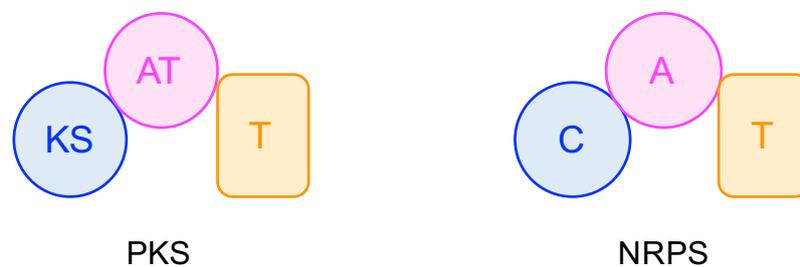
### a. Généralités sur la synthèse des composés PK et NRP

Les composés de type PK, NRP et PK-NRP sont des oligomères synthétisés par des complexes multienzymatiques, les mégasynthèses de type PK synthèses (PKS), NRP synthèses (NRPS) et hybrides PKS-NRPS. Les gènes à l'origine de la production de ces métabolites secondaires sont organisés en « clusters », ce qui permet leur activation de façon coordonnée et suggère une possibilité de transfert horizontal entre bactéries (67). La synthèse des composés de type PK et NRP repose sur l'assemblage itératif de monomères en un oligomère par les mégasynthèses qui agissent de façon séquentielle, formant de véritables chaînes d'assemblage.

Les monomères sont des unités acyles portant un groupe carboxyle activé pour les composés PK et des acides aminés ou des acides aryles pour les NRP. L'organisation de chaque mégasynthase repose sur trois domaines de base et est résumée dans la **Figure 8** (67,68).

- Le domaine de thiolation (T) qui fixe l'oligomère en cours d'élongation
- Le domaine kétosynthase (KS) des PKS ou de condensation (C) des NRPS
- Le domaine acyltransférase (AT) des PKS ou d'adénylation (A) des NRPS

L'ordre typique des domaines est KS-AT-T pour les PKS et C-A-T pour les NRPS.

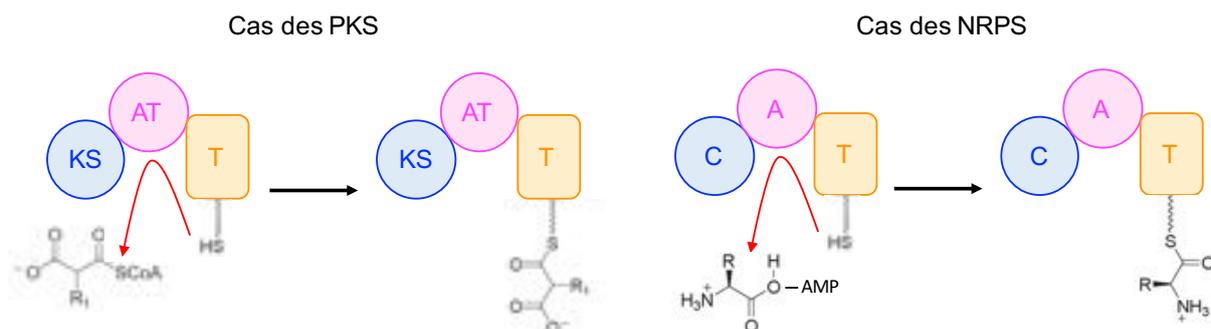


**Figure 8 : Domaines essentiels des modules de PKS et de NRPS.**

Modifié d'après Fischbach M. et Walsh C. (67)

La première étape de la biosynthèse est l'activation de chaque domaine T par des phosphopantéthéinyl transférases (PPTases) dont les gènes sont le plus souvent compris dans les « clusters » codant les mégasynthases. Le domaine T possède alors un groupement thiol libre qui permettra l'ancrage des monomères. En parallèle, les monomères composant les PK et les NRP sont également activés par une liaison au coenzyme A pour les PK et par la formation d'un amino-acyl-AMP (adénosine monophosphate) par réaction avec l'ATP (adénosine triphosphate) pour les NRP (67,68).

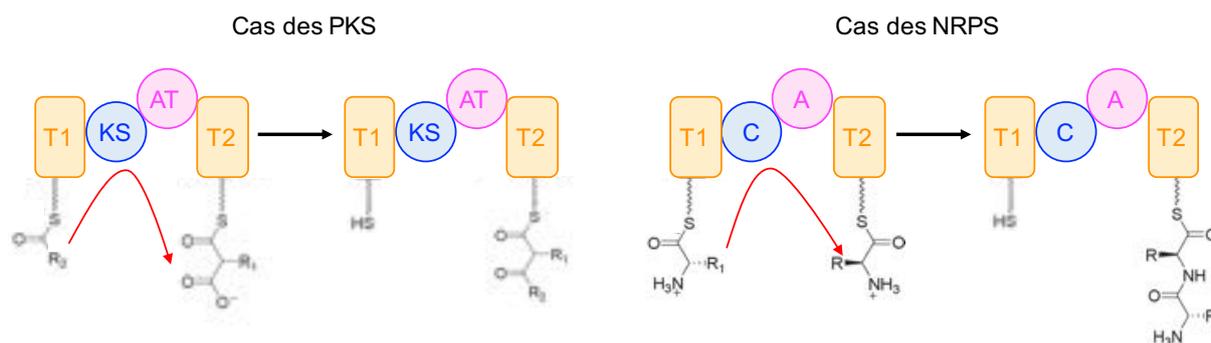
La biosynthèse *stricto sensu* des composés de type PK ou NRP consiste en l'élongation de l'oligomère par incorporation d'un monomère activé par liaison covalente à chaque transfert d'une mégasynthase à la suivante le long de la chaîne d'assemblage. Les monomères activés sont sélectionnés spécifiquement et transférés sur les domaines T activés par les domaines AT des PKS et A des NRPS, formant ainsi respectivement des acyl-thioesters et des aminoacyl-thioesters (**Figure 9**) (67).



**Figure 9 : Activité des domaines AT des PKS et A des NRPS.**

Les domaines AT et A sélectionnent les monomères activés et catalyse leur transthioylation aux domaines T. Modifié d'après Fischbach M. et Walsh C. (67)

Les domaines KS ou C permettent le transfert et la condensation de l'oligomère en croissance avec les monomères. A chaque étape, l'oligomère est transloqué du domaine T de la mégasynthase  $n$  au domaine T de la mégasynthase  $n+1$  (**Figure 10**) (67).



**Figure 10 : Activités des domaines KS des PKS et C des NRPS.**

Modifié d'après Fischbach M. et Walsh C. (67)

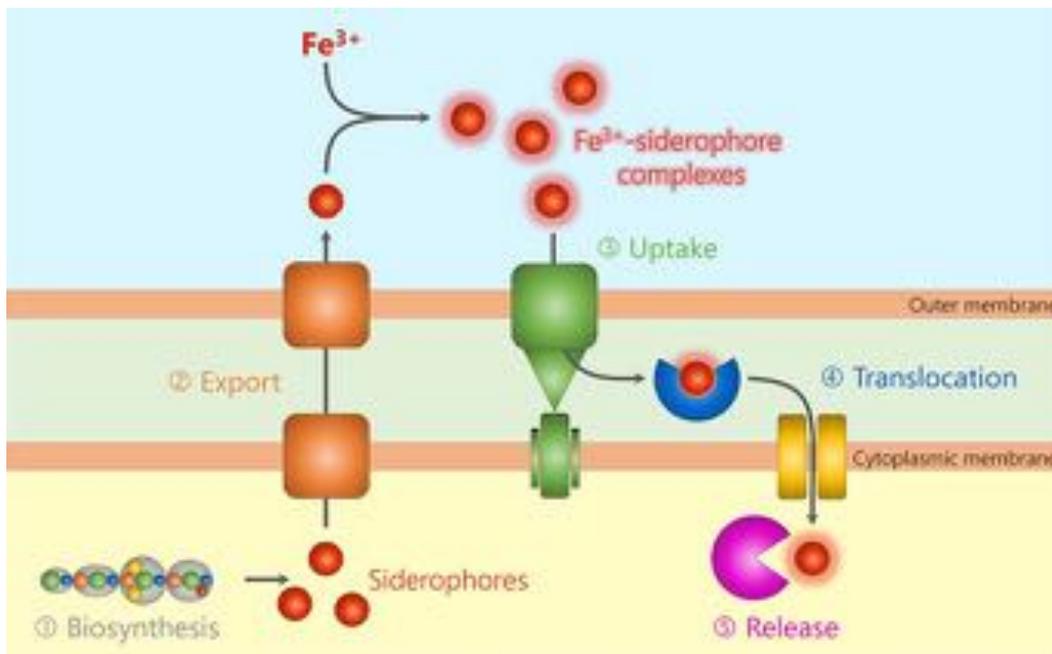
Les oligomères formés peuvent être modifiés pendant ou après l'assemblage par des domaines optionnels des mégasynthèses ou par des enzymes accessoires souvent codées par le « cluster » comprenant les gènes des mégasynthèses. Des réactions de réduction, de déshydratation, de cyclisation, d'oxydation peuvent par exemple être catalysées. Le dernier module de la chaîne d'assemblage ou module de terminaison comporte un domaine thioestérase permettant de libérer l'oligomère synthétisé (67,68).

Ces principes généraux de synthèse des composés de type PK et NRP s'appliquent à la production de l'entérobactine, des salmochélines et de la yersiniabactine.

### b. Synthèse et export des sidérophores de *E. coli* Nissle

Les principales étapes de la captation du fer par *E. coli* sont les mêmes pour les quatre sidérophores de *E. coli* Nissle (**Figure 11**). Il s'agit de (65) :

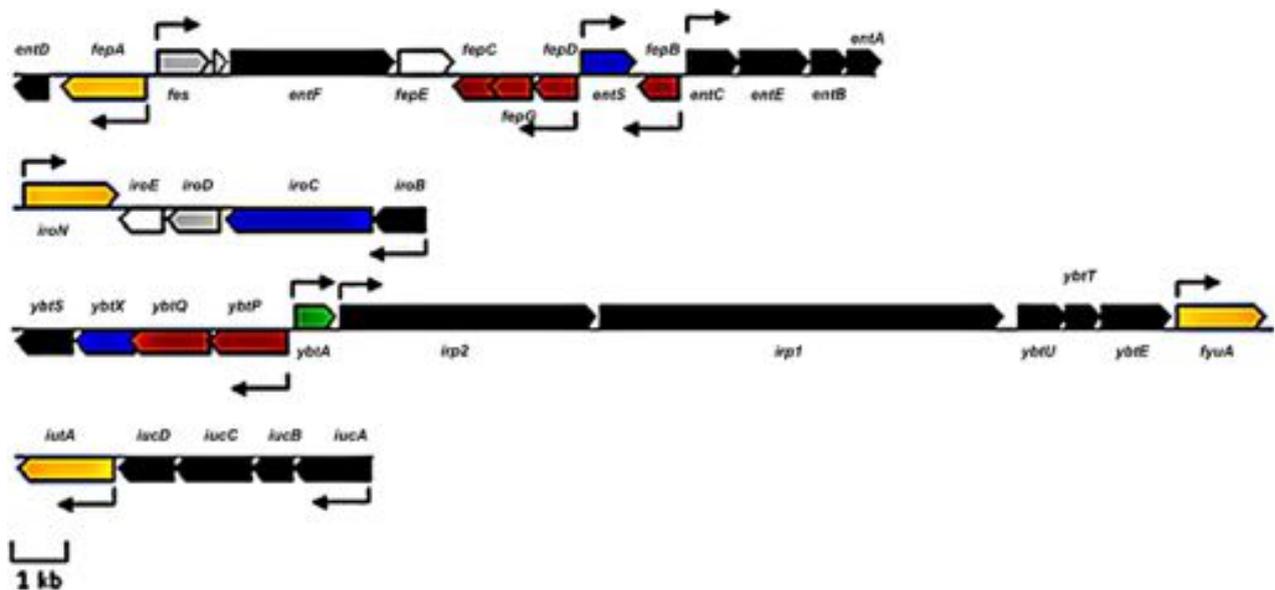
- 1) la biosynthèse du sidérophore
- 2) l'export du sidérophore hors de la bactérie. Le sidérophore qui a une très forte affinité pour le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) va former un complexe ferri-sidérophore
- 3) la reconnaissance des complexes ferri-sidérophores par des récepteurs de la membrane externe de la bactérie
- 4) l'internalisation des complexes ferri-sidérophores
- 5) la libération du fer dans le cytoplasme



**Figure 11** : Principales étapes de la captation du fer par les sidérophores.  
D'après Martin P. *et al.* (65)

Les composants assurant ces différentes fonctions sont codés par des gènes organisés en « clusters » (**Figure 12**).

Nous détaillerons davantage la biosynthèse de l'entérobactine et des salmochélines, car les sidérophores-microcines produites par *E. coli* Nissle qui feront l'objet de la deuxième partie de cette synthèse bibliographique comportent un groupement glycosylé dérivé de l'entérobactine.



**Figure 12 : « Clusters » de gènes permettant la production des quatre sidérophores de *E. coli* Nissle.**

Les « clusters » permettant la synthèse de l'entérobactine, des salmochélines, de la yersiniabactine et de l'aérobactine sont représentés de haut en bas. Les gènes permettant la biosynthèse des sidérophores sont figurés en noir, leur export en bleu, leur recapture en jaune, leur internalisation dans le cytoplasme en rouge et leur dégradation en gris.

D'après Garénaux A. *et al.* (69)

- L'entérobactine

La biosynthèse de l'entérobactine comporte deux parties distinctes. La première consiste en la synthèse d'un précurseur, le chorismate par la voie des shikimates. Cette voie de biosynthèse est principalement impliquée dans la synthèse des acides aminés aromatiques. Par conséquent, la tyrosine, la phénylalanine et le tryptophane inhibent la production du chorismate et par la même de l'entérobactine.

A partir du chorismate, les enzymes EntC, EntB et EntA forment le 2,3-dihydroxybenzoate. Ce composé et l'acide aminé sérine sont ensuite pris en charge par un complexe de type NRPS regroupant EntB, EntE et EntF qui produit l'entérobactine, correspondant à un triester de 2,3-dihydroxybenzoyl sérine (DHBS). L'activation préalable des domaines T est réalisée par la PPTase EntD (69,70). L'entérobactine est finalement exportée hors de la bactérie par la protéine d'export EntS de la famille des « major facilitator superfamily » (MFS) couplée à la protéine de membrane externe TolC (69,71).

- Les salmochélines

Le système génétique impliqué dans la synthèse et le transport des salmochélines est regroupé en un « cluster » nommé locus *iroA*. Les salmochélines sont un mélange de dérivés de l'entérobactine qui ont été glycosylés sur un, deux ou trois de leurs groupements DHBS. La glucosyltransférase IroB réalise ces transferts de résidus glucose à partir de l'uracile-diphosphate-glucose (64).

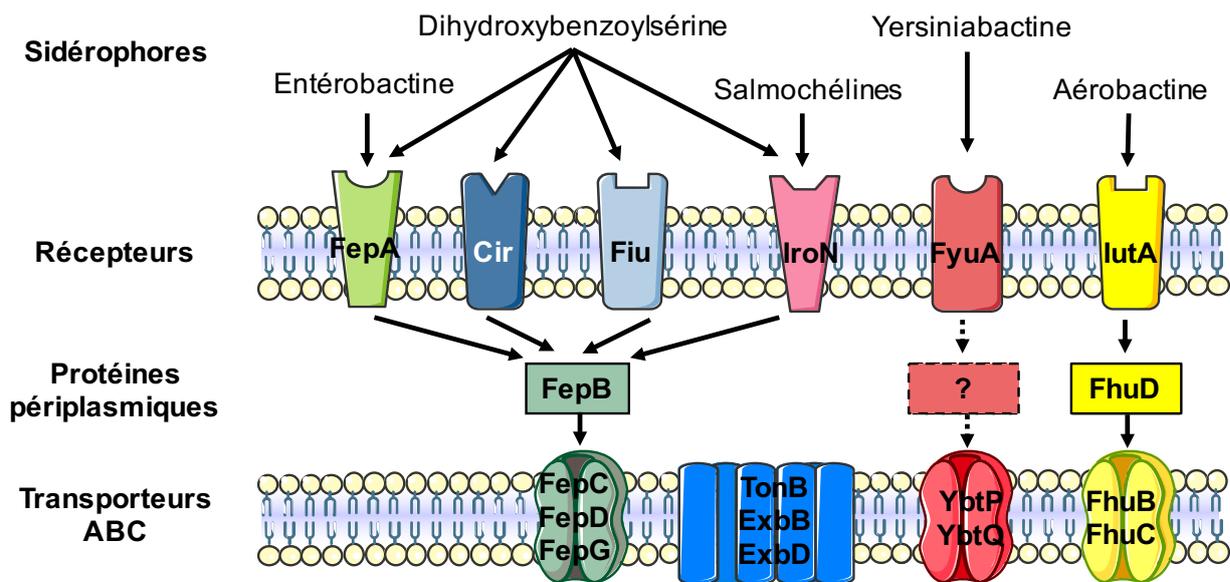
L'action des estérases IroD et IroE produit des formes linéarisées à partir des salmochélines cycliques. Les salmochélines di- et tri-glycosylées devenues trop volumineuses pour la protéine d'export de l'entérobactine EntS sont exportées par la protéine de transport spécifique IroC de la famille des ABC couplée à la protéine TolC. En revanche, les salmochélines mono-glycosylées sont extrudées par EntS (64,69,70).

- La yersiniabactine et l'aérobactine

La yersiniabactine est, comme l'entérobactine, formée à partir du chorismate. La deuxième partie de sa biosynthèse fait appel à une machinerie mixte PKS et NRPS. L'aérobactine est produite à partir de L-lysine et d'acétyl-coenzyme A par une voie indépendante des PKS-NRPS. Le mécanisme d'export de la yersiniabactine et de l'aérobactine hors de la bactérie n'est pas élucidé. Le gène *ybtX* codant une perméase est possiblement impliqué dans l'export de la yersiniabactine (69,70).

### c. Recapture des sidérophores

Une fois complexés au fer, les quatre types de sidérophores synthétisés par *E. coli* Nissle sont reconnus et internalisés par des systèmes différents, qui suivent néanmoins un processus similaire. Le sidérophore est reconnu à la surface de la bactérie puis transféré dans le périplasme où il est pris en charge par une protéine périplasmique. Cette dernière transporte le sidérophore vers un complexe protéique formant un transporteur de type « ATP binding-cassette » (ABC) dans la membrane interne, ce qui permet au sidérophore d'être importé dans le cytoplasme. Pour la yersiniabactine, le rôle d'une protéine périplasmique est encore discuté (**Figure 13**) (69,70).



**Figure 13** : Import des quatre types de sidérophores complexés au fer chez *E. coli* Nissle.

Modifié d'après Garénaux A. *et al.* (69)

Les récepteurs de la membrane externe reconnaissent les sidérophores différent selon le sidérophore (**Figure 13**) : l'entérobactine est reconnue par FepA et IroN, les salmochélines par IroN, la yersiniabactine par FyuA et l'aéro bactéine par IutA (69–71). Par ailleurs, un produit de dégradation de l'entérobactine, la DHBS peut en condition de carence en fer jouer le rôle de sidérophore. Elle est reconnue par FepA, IroN, Fiu ou Cir (72).

Quel que soit le type de sidérophore, tous ces récepteurs dépendent du système TonB/ExbB/ExbD. Ce complexe protéique enchâssé dans la membrane interne transfère l'énergie de la force protomotrice de la membrane interne vers la membrane externe. Cela apporte aux récepteurs des sidérophores situés dans la membrane externe l'énergie nécessaire à l'internalisation des sidérophores couplés au fer dans le périplasme (71).

Une fois dans le cytoplasme, le fer est libéré du sidérophore par l'action de réductases qui transforment le fer ferrique lié au sidérophore en fer ferreux libre ou chélaté par d'autres protéines bactériennes. Ce mécanisme suffit à la libération de l'aéro bactéine et probablement de la yersiniabactine, même si la libération du fer de ce dernier sidérophore n'a pas été totalement élucidée (69,70).

A l'inverse, la libération du fer depuis le complexe ferri-entérobactine nécessite l'action d'une estérase Fes donnant naissance à la DHBS. De même, les complexes ferri-salmochélines sont dégradés par l'estérase cytoplasmique IroD et l'hydrolase périplasmique IroE pour permettre la libération du fer. L'estérase IroD peut également agir sur les complexes ferri-entérobactines (64,70,73).

#### **d. Rôles des sidérophores dans la colonisation et la virulence**

L'entérobactine est le sidérophore le plus communément produit par les souches de *E. coli* qu'elles soient pathogènes ou non. C'est également le sidérophore avec l'affinité la plus forte pour le fer jamais décrite (64,70). Il s'agit donc d'un facteur permettant à la souche productrice de survivre en conditions de carences en fer.

Cependant, en cas d'inflammation aiguë, les mammifères produisent de la lipocaline-2 qui complexe l'entérobactine, empêchant ainsi la recapture par les récepteurs FepA des bactéries. La production de lipocaline-2 est également induite par les TLR-4 activés notamment par le lipopolysaccharide (64,70,74). En résumé, en situation d'infection bactérienne, l'organisme accroît la carence en fer par des mécanismes non spécifiques (augmentation de la production ferritine par exemple) et spécifiques qui rendent inefficace l'acquisition du fer par l'entérobactine (synthèse de lipocaline-2).

La modification de l'entérobactine en salmochélines liée à la glycosylation par IroB permet d'échapper à la séquestration par la lipocaline-2. Le locus *iroA* permettant la production de salmochélines est porté par des plasmides de virulence ou intégré dans le chromosome (69).

Il a été montré dans un modèle d'infection de souris que la production de salmochélines était un facteur de virulence en soi. En effet, alors que 80% de souris survivent à une injection intrapéritonéale de la souche *E. coli* H9049 non pathogène, seulement 10% survivent à une injection de la même souche possédant un plasmide portant *iroA* (74). Fischbach M. *et al.* décrivent cette stratégie d'évasion à un mécanisme de l'immunité innée comme unique, car la bactérie acquiert un système métabolique complet de synthèse, d'export et de dégradation pour préserver l'efficacité de son système initial de captation du fer. La complexité du système mis en œuvre pour contrecarrer la séquestration par la lipocaline-2 atteste de l'importance du système de captation par l'entérobactine pour la bactérie (64,74).

La yersiniabactine est synthétisée principalement par les souches ExPEC. Les gènes permettant la production de yersiniabactine ont ainsi été retrouvés dans plus de 70 % des souches de *E. coli* isolées d'hémocultures, de liquides céphalo-rachidiens et d'urines. (75).

Au-delà de son simple rôle dans l'acquisition du fer pour la survie de la bactérie, le récepteur FyuA de la yersiniabactine est nécessaire pour la formation de biofilm par les souches uropathogènes de *E. coli* (UPEC) (76). Par ailleurs, la yersiniabactine peut également chélater le cuivre, ce qui constitue un mécanisme de résistance à la dégradation par les cellules phagocytaires. En effet, un des systèmes bactéricides utilisés par ces cellules pour dégrader une bactérie est d'élever la concentration en cuivre à un niveau toxique à l'intérieur du phagosome. En plus de constituer un mécanisme de résistance au système immunitaire, la chélation de cuivre par la yersiniabactine peut constituer un apport « nutritionnel » supplémentaire pour la bactérie, car le cuivre est cofacteur de nombreuses réactions enzymatiques (77).

L'aérobactine est décrite comme un facteur de virulence, car elle est davantage produite par les souches de *E. coli* pathogènes (environ 75 % des souches de pyélonéphrites, 70 % des souches de bactériémies) que par les isolats fécaux (environ 35 %) (78). De plus, la virulence d'une souche de *E. coli* pathogène aviaire est diminuée en cas d'inactivation du système de production ou de recapture de l'aérobactine dans des modèles d'infections de poulets (69,79).

Pouvoir, comme *E. coli* Nissle capter le fer *via* quatre types de sidérophores est une capacité rare, et davantage retrouvée chez des souches pathogènes et en particulier uropathogènes. L'efficacité de ces différents sidérophores dépend des conditions environnementales dans lesquelles est placée la souche. Ainsi, les salmochélines et la yersiniabactine sont surtout produites en conditions de pH neutre ou alcalin, alors que la synthèse d'aérobactine est maximale à pH plus acide (pH 5,6). D'ailleurs, les sidérophores de type hydroxamates sont plus stables à pH acide que les catécholates (80). Grâce à ces quatre types de sidérophores, *E. coli* Nissle s'assure donc une captation de fer optimale dans des niches écologiques variées.

Au-delà de leur rôle dans cette « sécurité nutritionnelle », les sidérophores peuvent aussi être des facteurs de virulence permettant d'entrer en compétition avec d'autres bactéries au sein d'une niche écologique. En effet, l'entérobactine est un constituant des sidérophores-microcines, peptides antimicrobiens produit notamment par *E. coli* Nissle, sur lesquels nous reviendrons lors de la deuxième partie de cette synthèse bibliographique.

#### **IV. Comparaison avec les souches phylogénétiquement proches ABU83972 et CFT073**

Dans le paragraphe précédent consacré aux déterminants de l'activité probiotique de *E. coli* Nissle, nous avons à plusieurs reprises mentionné le partage de facteurs de virulence avec des souches uropathogènes (ex : fimbriae F1C, production de quatre types de sidérophores). Des analyses génétiques ont montré que *E. coli* Nissle est très proche des souches urinaires de *E. coli* ABU83972 et CFT073 (49,81,82). Toutes appartiennent au séro groupe O6 et au « sequence type » (ST) 73.

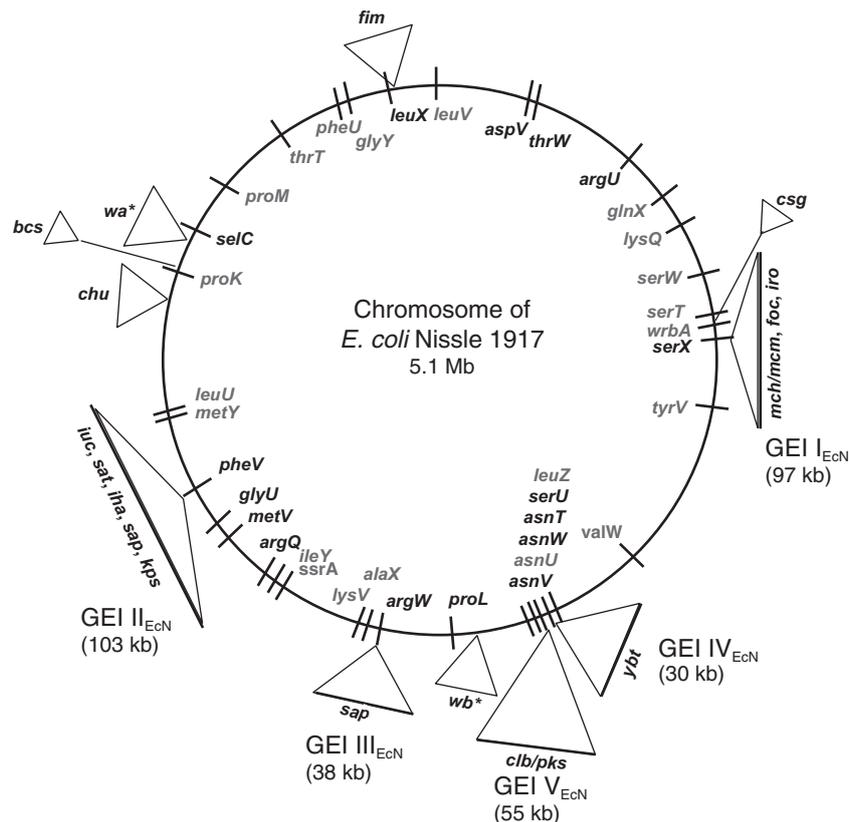
*E. coli* ABU83972 est une souche de bactériurie asymptomatique isolée des urines d'une fillette qui l'a porté de façon asymptomatique pendant 3 ans. Son utilisation « probiotique » pour prévenir les infections urinaires a été envisagée. A l'inverse, la souche pathogène *E. coli* CFT073 est issue d'un prélèvement sanguin d'une femme présentant une pyélonéphrite aiguë (81). La proximité avec la souche *E. coli* CFT073 pose la question de l'innocuité de l'utilisation de *E. coli* Nissle comme probiotique. En parallèle, la proximité avec *E. coli* ABU83972 permet de mieux comprendre les mécanismes de l'activité probiotique de *E. coli* Nissle. C'est pourquoi nous consacrons ce paragraphe à la synthèse des travaux ayant étudié les similarités et différences entre les génomes de ces trois souches.

## 1. Un lien de parenté avec les souches ABU83972 et CFT073

La comparaison de la taille des génomes de la souche de *E. coli* K12 MG1655 et des souches Nissle et CFT073 a révélé que le chromosome de *E. coli* Nissle possédait 0,74 millions de paires de bases (Mb) de plus que MG1655 (5,44 Mb contre 4,7 Mb) mais seulement 0,21 Mb de plus que CFT073 (5,23 Mb) et 0,13 Mb de plus que ABU83972 (5,31 Mb) (20). De plus, l'utilisation de puces à ADN spécifiques du génome de *E. coli* K12 a révélé que les souches *E. coli* Nissle et CFT073 ont le même contenu en génome spécifique de *E. coli* K12. Ainsi, ces souches MG1655, ABU83972, CFT073 et Nissle partagent un pool de gènes communs, mais les génomes de *E. coli* CFT073, ABU83972 et Nissle sont plus grands du fait de l'acquisition de régions génomiques par transfert horizontal (49).

La souche MG1655 appartient au phylogroupe A, alors que les souches CFT073, ABU83972 et Nissle appartiennent au phylogroupe B2, de même que la plupart des souches ExPEC. Les souches du phylogroupe B2 sont décrites comme renfermant le plus grand nombre de facteurs de virulence, généralement acquis par transfert horizontal (5,83). Les gènes de ces facteurs de virulence sont, pour beaucoup, portés par des îlots de pathogénicité aussi appelés îlots génomiques.

Les îlots génomiques sont définis comme des blocs de gènes codant des facteurs de virulence qui sont absents des souches commensales. Ils possèdent un contenu en bases G+C différent du reste du chromosome de la souche, ce qui suggère une origine étrangère. Ils renferment des éléments de mobilité comme des séquences d'insertion ou des gènes codant des intégrases suggérant des événements de recombinaison et de transposition. Enfin, les îlots de pathogénicité sont insérés dans le génome à proximité de gènes d'acides ribonucléiques (ARN) de transfert (ARNt) qui sont des sites privilégiés d'insertion d'éléments génétiques mobiles (83).



**Figure 14 : Carte schématique du génome de *E. coli* Nissle.**

Les cinq îlots génomiques (GEI) sont représentés, ainsi que leurs sites d'insertion avec les gènes d'ARNt correspondants. D'après Sonnenborn U. et Schulze J. (8)

*E. coli* Nissle possède cinq îlots génomiques (**Figure 14**) (8,49)

- L'îlot génomique I, au locus *serX* porte les gènes permettant la synthèse des sidérophores microcines H47 et M (voir 2e partie de cette synthèse bibliographique) et des fimbriae F1C (*foc*), ainsi que le locus *iroA*.
- L'îlot génomique II, au locus *pheV* porte notamment les gènes permettant la production et la recapture de l'aérobactine (*iuc*) et la synthèse de la capsule (*kps*)
- L'îlot génomique III, au locus *argW* porte les gènes codant la synthèse d'un autotransporteur de type Sap.
- L'îlot génomique IV, au locus *asnT* porte les gènes permettant la production et la recapture de la yersiniabactine. En raison de la fréquence à laquelle il est retrouvé parmi les souches de *E. coli* pathogènes, cet îlot est également appelé HPI pour « high pathogenicity-island »
- L'îlot génomique V, au locus *asnW* est également appelé îlot *pks*. Il porte les gènes responsables de la synthèse de la colibactine qui fera l'objet de la 3e partie de cette synthèse bibliographique.

Des études utilisant des sondes d'hybridation ADN, puis le séquençage complet des souches ont révélé que les souches de *E. coli* Nissle, ABU83972 et CFT073 étaient génétiquement liées, Nissle étant plus proche de la souche pathogène CFT073 que de ABU83972 (20,49,81). Sur les 5324 gènes prédits lors du séquençage complet de *E. coli* Nissle, seuls 190 (soit 3,6 %) sont absents des souches CFT073 et ABU83972 (20). Les cinq îlots génomiques identifiés pour *E. coli* Nissle sont présents pour les trois souches. Les îlots I, IV et V sont très conservés entre ces souches probiotiques ou pathogènes, ce qui tendrait à prouver qu'ils portent des déterminants de colonisation plutôt que des facteurs de virulence *stricto sensu* (81).

## **2. *E. coli* Nissle, un pathogène « déconstruit »**

Peu de différences génétiques séparent les souches probiotiques *E. coli* Nissle et ABU83972 de la souche pathogène CFT073. L'îlot génomique II est le support de plusieurs variations. Les gènes codant l'hémolysine  $\alpha$  (*hlyA*) et les fimbriae P (*pap*) sont absents de *E. coli* Nissle. Ces gènes ont été décrits comme des facteurs de virulence, en particulier pour les UPEC. L'hémolysine  $\alpha$  induit par exemple des dommages cellulaires, ce qui relargue des nutriments dont la bactérie peut profiter. Les fimbriae P et les adhésines Pap portées à leurs extrémités permettent d'adhérer à l'épithélium de l'arbre urinaire. L'allèle PapG2 porté par la souche CFT073 est lié au développement de pyélonéphrites (81).

Par ailleurs, alors que la souche CFT073 possède une capsule de type K2, les souches Nissle et ABU83972 ont une capsule K5 qui ne confère pas de résistance au sérum, mais exerce une action immunomodulatrice (voir paragraphe III 3 a) (49).

Des variations au niveau du lipopolysaccharide ont également été décelées. L'antigène O6 représente la chaîne polysaccharidique constituant la partie la plus externe du lipopolysaccharide. Cette chaîne est anormalement courte pour *E. coli* Nissle du fait d'une mutation ponctuelle introduisant un codon stop dans le gène codant la polymérase de l'antigène O6. Il en résulte un phénotype « semi-rugueux » lorsque la souche est cultivée sur milieu gélosé, alors que la souche CFT073 possédant un antigène O6 « complet » a un phénotype « lisse ». Cette spécificité du

lipopolysaccharide de la souche Nissle explique probablement en partie la moindre immunotoxicité de Nissle par rapport à CFT073 et son rôle immunomodulateur (81,84).

Parallèlement à cette perte de facteurs de virulence par rapport à la souche CFT073, *E. coli* Nissle et ABU83972 ont une capacité améliorée de formation de biofilm que ce soit en milieu minimal ou dans l'urine. *E. coli* Nissle produit davantage de curli et de cellulose que CFT073, ce qui peut être en partie lié à la perte du gène *rcsA* qui inhibe les gènes permettant la synthèse des curli *csgAB* (81). Ainsi, la perte de virulence est accompagnée chez *E. coli* Nissle et ABU83972 d'un gain dans la capacité de colonisation.

Si *E. coli* Nissle semble avoir divergé de CFT073 en perdant ou en atténuant certains facteurs de virulence, cette divergence est encore plus forte pour la souche ABU83972. Cette dernière est incapable de produire des fimbriae de type 1 fonctionnels ou de type F1C. De même, elle a perdu plusieurs gènes impliqués dans la synthèse de l'antigène O et possède un phénotype « rugueux » (82).

Dans un modèle d'infection trans-urétrale de rats, *E. coli* Nissle a une capacité de colonisation de la vessie et des reins comparable à une souche non-uropathogène (8). Cependant, des bactéries de la souche Nissle ont été détectées dans les reins, ce qui n'a jamais été observé pour la souche ABU83972. Même si la souche *E. coli* Nissle n'a jamais été rapportée comme responsable d'infections urinaires, elle semble donc plus proche de CFT073 que de ABU83972 en termes de pouvoir pathogène urinaire.

En conclusion, les souches *E. coli* Nissle, CFT073 et ABU partagent la grande majorité de leurs génomes, et en particulier les facteurs permettant une colonisation optimale. La souche *E. coli* Nissle a divergé de CFT073 en améliorant sa capacité de colonisation et en perdant ou inactivant des facteurs de virulence. Ce phénomène est accentué pour la souche ABU83972. Ceci est probablement le résultat d'une coévolution avec le système immunitaire de l'hôte : les facteurs de virulence engendrent une réponse immunitaire de l'hôte qui est délétère pour la bactérie. La souche ABU83972 limite la réaction de l'hôte pour persister durablement dans la vessie (82).

Ainsi, *E. coli* Nissle possède de nombreux facteurs de virulence. Comme cette souche est dépourvue de pouvoir pathogène, ces derniers sont plutôt qualifiés de facteurs de « fitness » ou de déterminants de l'activité probiotique.

## Les sidérophores-microcines

Ainsi que nous l'avons évoqué dans la première partie de cette synthèse bibliographique, les propriétés antagonistes de *E. coli* Nissle à l'origine de la description de cette souche par Alfred Nissle sont liées à la production de deux sidérophores-microcines. Cette partie est consacrée à une revue de la littérature existante concernant ces peptides antimicrobiens qui sont des déterminants majeurs de l'activité probiotique de *E. coli* Nissle.

### I. Classification et nomenclature

Les appellations qui désignent les peptides antimicrobiens produits par les bactéries sont nombreuses et héritées de l'histoire de leur découverte. Elles se recoupent souvent et sont sources de confusion. A l'origine, « bactériocine » était un terme générique qui désignait les peptides antimicrobiens produits par tous types de bactéries. Des désignations plus précises ont ensuite été créées en utilisant des préfixes se rapportant au genre ou à l'espèce bactérienne qui produit la toxine. Ainsi, les « colicines » sont synthétisées par *E. coli*, les « cloacines » par *Enterobacter cloacae* et les « pyocines » par *Pseudomonas aeruginosa* par exemple. En l'absence de règles fixes de nomenclature, plusieurs noms ont parfois été donnés à la même molécule, par exemple la « staphylococcine 1580 » également appelée « épidermine » produite par *Staphylococcus epidermidis*. Pour amorcer une clarification, il a été proposé que le terme « bactériocines » soit réservé aux peptides antimicrobiens synthétisés par les bactéries à Gram positif (85).

Les peptides antimicrobiens produits par les bactéries à Gram négatif, et plus particulièrement les entérobactéries sont classés en fonction de leur taille : les peptides antimicrobiens de haut poids moléculaires (> 10 kilodaltons ; kDa) sont des colicines, ceux de faible poids moléculaires (< 10 kDa) des microcines (86,87). Le terme « colicines » n'est donc plus réservé aux seuls peptides antimicrobiens sécrétés par *E. coli*.

Quatorze microcines ont été décrites, mais seules 8 ont été isolées et caractérisées chimiquement (88). Toutes partagent des caractéristiques physico-chimiques communes : elles sont thermostables, relativement hydrophobes, résistantes à certaines protéases et aux pH extrêmes (86,87). Les microcines ont été classées en fonction de leurs tailles et de la modification ou non du précurseur peptidique suite à la traduction (88) :

- Les microcines de classe I ont une faible masse moléculaire (< 5 kDa) et subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles.
- Les microcines de classe II ont une masse moléculaire plus importante (5 à 10 kDa) et se subdivisent en deux sous-classes :
  - les microcines de classe IIa ne subissant pas de modification post-traductionnelle
  - les microcines de classe IIb qui peuvent porter une modification post-traductionnelle dans leur partie C-terminale

Quatre microcines, les microcines D93, 140, 15m et 15n n'ont jamais pu être classées faute de données suffisantes. Leurs masses moléculaires semblent avoisiner 1 kDa (88). Les caractéristiques générales des 10 microcines connues sont résumées dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2 : Caractéristiques générales des dix microcines connues.**

Modifié d'après Duquesne S. *et al.* (88)

Microcine	Classe	Masse moléculaire (Da)	Modification post-traductionnelle	Caractérisation chimique
B17	I	3093	+	+
C7/C51	I	1177	+	+
J25	I	2107	+	+
L	IIa	8884	-	+
24 or N	IIa	7274	-	+
V	IIa	8733	-	+
E492	IIb	8717	+	+
H47	IIb	4865	+	-
I47	IIb	6276	+	-
M	IIb	7283	+	+

Les sidérophores-microcines appartiennent à la classe IIb. Elles sont ainsi nommées car leur précurseur peptidique peut être modifié à sa partie C-terminale par l'ajout d'un groupement dérivé du sidérophore entérobactine (89). Quatre sidérophores-microcines ont été décrites : les microcines E492, H47, I47 et M. La microcine E492 est produite par la souche de *Klebsiella pneumoniae* RYC492 isolée de selles humaines (90). La microcine H47 a été initialement étudiée dans la souche fécale humaine *E. coli* H47 (91). Comme la microcine M, elle est également produite par les souches fécales *E. coli* Nissle, CA46 et CA58 (9,92,93). Les microcines H47 et M avaient d'ailleurs été tout d'abord nommées colicines G et H (9). L'existence de la microcine I47 a été révélée par l'étude des systèmes génétiques responsables de la synthèse des microcines chez les souches *E. coli* H47 et CA46 (94).

Peu d'études se sont intéressées aux sidérophores-microcines et elles concernent en majorité la microcine E492. Trois équipes sont à l'origine de la quasi-totalité de la littérature au sujet des sidérophores-microcines : l'équipe chilienne du Pr Rosalba Lagos (Santiago) pour la microcine E492, l'équipe uruguayenne du Pr Magela Laviña (Montevideo) pour les microcines H47 et I47 et l'équipe du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris du Pr Sylvie Rebuffat pour les microcines E492, H47 et M.

## **II. Systèmes génétiques**

### **1. Une organisation générale conservée**

Les gènes nécessaires à la synthèse et à l'excrétion des microcines sont groupés en « clusters » portés par des plasmides dans le cas des microcines de classes I et IIa et par le chromosome en ce qui concerne les sidérophores-microcines (88,94). La structure minimale comprend : un gène codant le précurseur peptidique de la microcine, un gène spécifique conférant une immunité protectrice spécifique contre la microcine et des gènes permettant la synthèse du système d'export de la microcine (88,94). Le « cluster » porte également très fréquemment des gènes codant des enzymes impliquées dans des modifications post-traductionnelles.

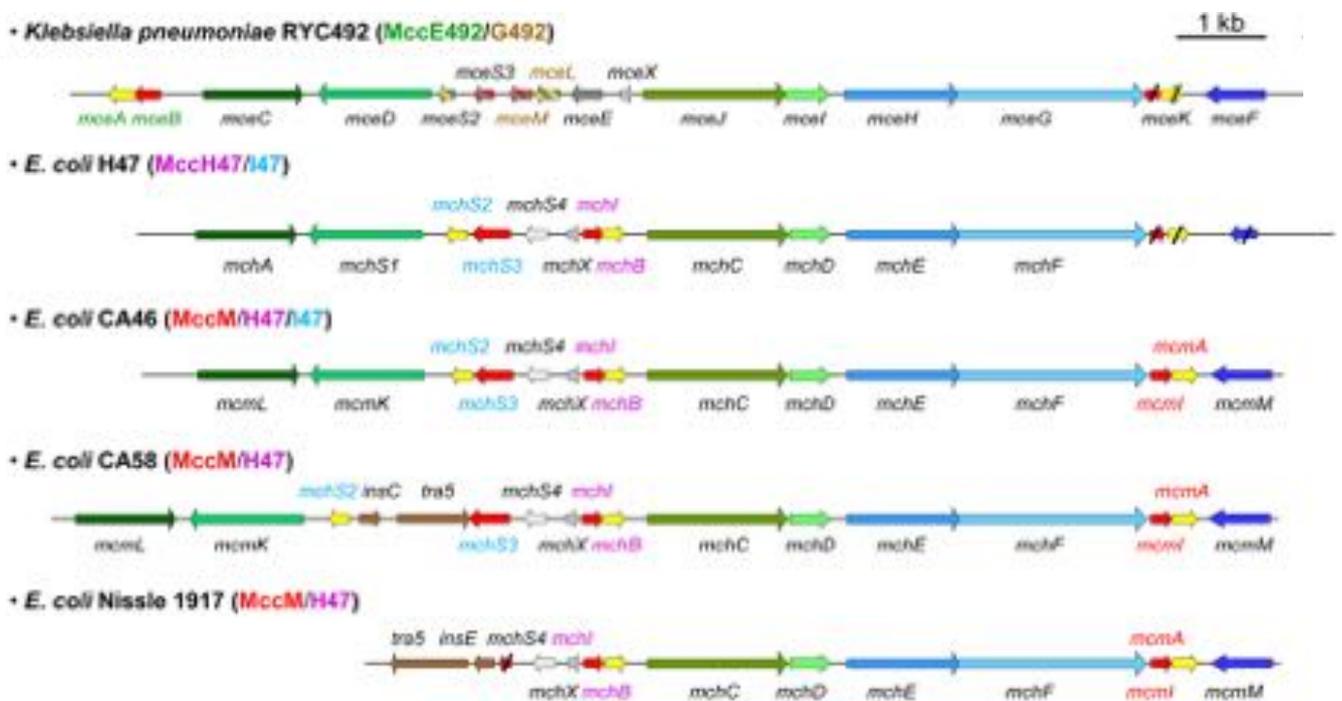
La **Figure 15** résume l'organisation des principaux « clusters » de gènes permettant la synthèse et l'export des 4 sidérophores-microcines. Nous reviendrons plus en détails dans le paragraphe suivant sur le rôle de chacune des protéines dans la synthèse des sidérophores-microcines.

Les précurseurs peptidiques des microcines E492, H47, I47 et M comprennent respectivement 103, 75, 77 et 92 acides aminés qui sont codés par les gènes *mceA*, *mchB*, *mchS2* et *mcmA*. Les gènes codant chacun de ces précurseurs peptidiques sont organisés en opéron avec le gène codant la protéine d'auto-immunité. Il s'agit de *mceB*, *mchl*, *mchS3* et *mcmI* pour les microcines E492, H47, I47 et M. Lorsque plusieurs microcines sont codées par un même « cluster » (ex : *E. coli* Nissle), le système d'export et les gènes impliqués dans les modifications post-traductionnelles peuvent être communs. Cependant, chaque microcine conserve sa protéine d'immunité dédiée (88,94–96).

Les gènes *mceC*, *mchA* et *mcmL* sont homologues au gène *iroB* de l'îlot salmochéline, codant une glucosyltransférase responsable de la glycosylation de l'entérobactine. De même, *mceD*, *mchS1* et *mcmK* sont des homologues du gène *iroD* codant une estérase de l'entérobactine permettant sa linéarisation (9,95). Les protéines MceI et MceJ, et par homologie MchC et MchD, sont responsables de la liaison des précurseurs peptidiques avec le groupement sidérophore dérivé de l'entérobactine, mais la fonction précise de chacune des protéines reste inconnue (97).

L'export des sidérophores-microcines hors de la bactérie productrice repose sur un transporteur à trois composants de type ABC. Deux composants sont codés en opéron par les « clusters » sidérophores-microcines : la protéine ABC *stricto sensu* (MchF pour les microcines H47 et M, MceG pour la microcine E492) et la protéine accessoire « membrane fusion protein » (MFP) (MchE pour les microcines H47 et M, MceH pour la microcine E492). Ces protéines présentent de très fortes homologies : 92% et 94% d'acides aminés identiques respectivement entre les deux types de protéines ABC et MFP (9,95,98). Le troisième élément de ce système d'export est la protéine de la membrane externe ubiquitaire TolC.

L'export de la microcine E492 semble nécessiter la protéine MceF (95). Le rôle précis de cette protéine n'a jamais été établi. Son caractère indispensable n'a été observé que dans une seule étude (99) antérieure au séquençage du « cluster » de la microcine E492 (95). En raison de la forte homologie au niveau de la séquence en acides aminés avec MceF (62%), la protéine McmM serait impliquée dans l'export des microcines M et H47 (88).



**Figure 15** : Organisation des « clusters » de gènes permettant la synthèse des sidérophores-microcines.

Le nom des microcines est indiqué entre parenthèses à côté de chaque souche. Les noms des gènes codant les précurseurs peptidiques et les protéines d'immunité des microcines E492, H47, I47 et M sont écrits respectivement en vert, rose, bleu et rouge.

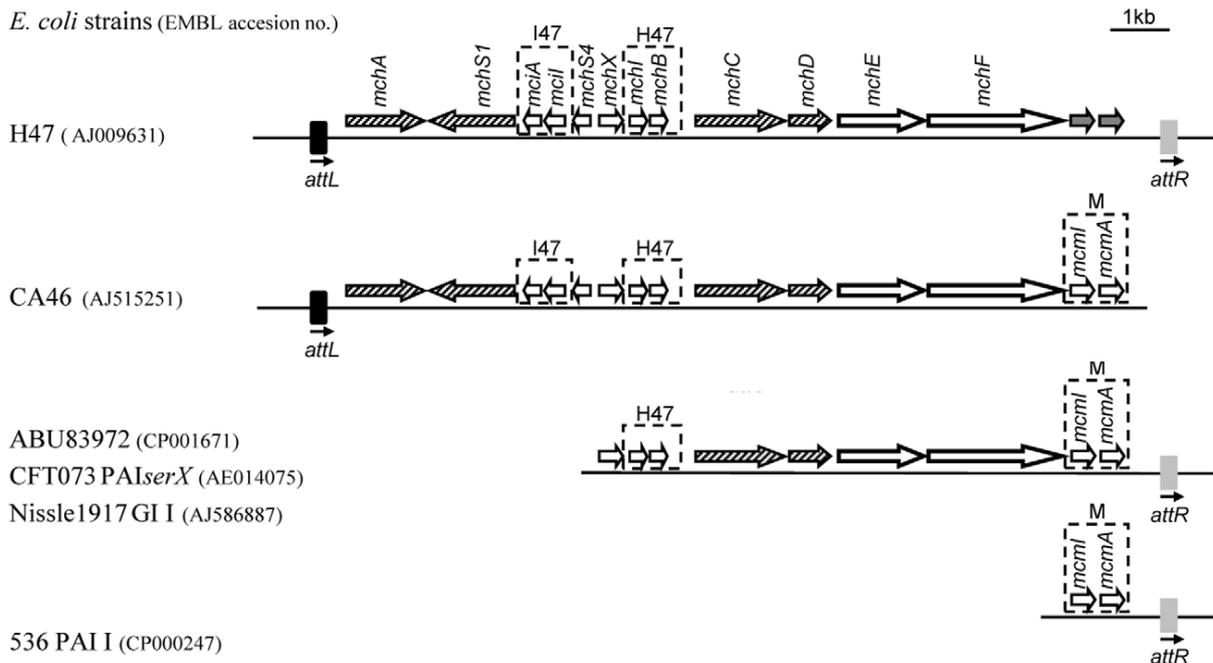
Les gènes codant les précurseurs peptidiques, les gènes d'auto-immunité, les gènes impliqués dans l'export des microcines et leurs modifications post-traductionnelles sont figurés respectivement en jaune, rouge, bleu et vert. Les gènes dont la fonction reste inconnue sont représentés en gris. Les gènes codant des transposases (*ins*, *tra*) sont figurés en marron. Les gènes tronqués sont représentés avec une barre oblique. D'après Vassiliadis G. *et al.* (93)

## 2. Des îlots sidérophores-microcines

Ainsi que nous l'avons mentionné dans la partie précédente de cette synthèse bibliographique, le « cluster » sidérophores-microcines est situé sur l'îlot génomique I très conservé entre les souches *E. coli* Nissle, CFT073 et ABU83972 (20,81). Il s'agirait donc de facteurs de virulence acquis par transfert horizontal. D'ailleurs, le contenu en bases G+C des « clusters » permettant la production des sidérophores-microcines est d'environ 40%, alors qu'il avoisine les 51% et 57,5% pour les différentes souches de *E. coli* et *K. pneumoniae* respectivement (88). Ces bactéries ne seraient donc pas les hôtes originels de ces « clusters ».

De plus, des séquences répétées (ou « direct repeats ») flanquent les « clusters » des souches CA46 et H47 (**Figure 16**). Pour les souches Nissle, CFT073 et ABU83972, seule la séquence *attR* est présente à droite du « cluster ». Une excision du « cluster » de la souche H47 a été réalisée expérimentalement, puis des intégrations dans des chromosomes de souches K12 principalement. Il a donc été proposé que les « clusters » sidérophores-microcines soient des îlots génomiques à part entière. A ce titre, nous parlerons dans la suite de nos travaux d'« îlot » sidérophores-microcines. De nombreux sites d'intégration potentiels de cet îlot ont été trouvés dans les banques de données, indiquant qu'il pourrait être très largement répandu parmi les souches de *E. coli* (100).

Si l'organisation générale des îlots sidérophores-microcines est conservée, les îlots présentent néanmoins des différences substantielles selon les souches. Ainsi, l'îlot des souches *E. coli* Nissle, CFT073 et ABU83972 est tronqué par rapport à la souche CA46 : les gènes codant le précurseur peptidique et la protéine d'immunité de la microcine I47, ainsi que les gènes de modifications post-traductionnelles des microcines H47 et M *mcmL* et *mcmK* sont absents (**Figure 15**) (9,94). Ces souches sont donc incapables de synthétiser la microcine I47. A la place des gènes « manquants », se trouvent des gènes codant des transposases, témoignant des événements de remaniements de l'îlot.



**Figure 16 : Comparaison des fragments d'ADN contenant le système génétique de production de la microcine H47.**

Les séquences répétées servant de site d'attachement gauche et droite sont figurées par *attL* et *attR*. Les gènes codant les peptides précurseurs et les protéines d'immunité de chaque système de sidérophores-microcines sont encadrés en pointillés.

D'après Azpiroz M. *et al.* (100)

Par ailleurs, les gènes codant le précurseur peptidique, la protéine d'immunité de la microcine M, ainsi que le gène *mcmM* sont tronqués sur l'îlot de la souche H47 par rapport à la souche CA46 (**Figure 15**). Elle ne produit donc pas la microcine M (9,94).

Des traces de remaniements sont également visibles au centre des îlots codant les sidérophores-microcines. Ainsi, pour la souche CA58, un élément génétique mobile est inséré entre les gènes *mchS2* et *mchS3* codant le précurseur peptidique et la protéine d'immunité de la microcine I47. Ces deux gènes étant normalement organisés en opéron, le processus de traduction ne peut avoir lieu, au moins pour le gène *mchS2* situé en aval de la séquence d'insertion (**Figure 15**). La souche CA58 ne produit donc pas la microcine I47, mais les microcines H47 et M (9,93,94).

Des gènes impliqués dans la synthèse des microcines ont également été identifiés dans la souche uropathogène *E. coli* 536 (**Figure 16**). Chez *E. coli* Nissle, l'îlot sidérophores-microcines est porté par l'îlot génomique I inséré au locus *serX*, de

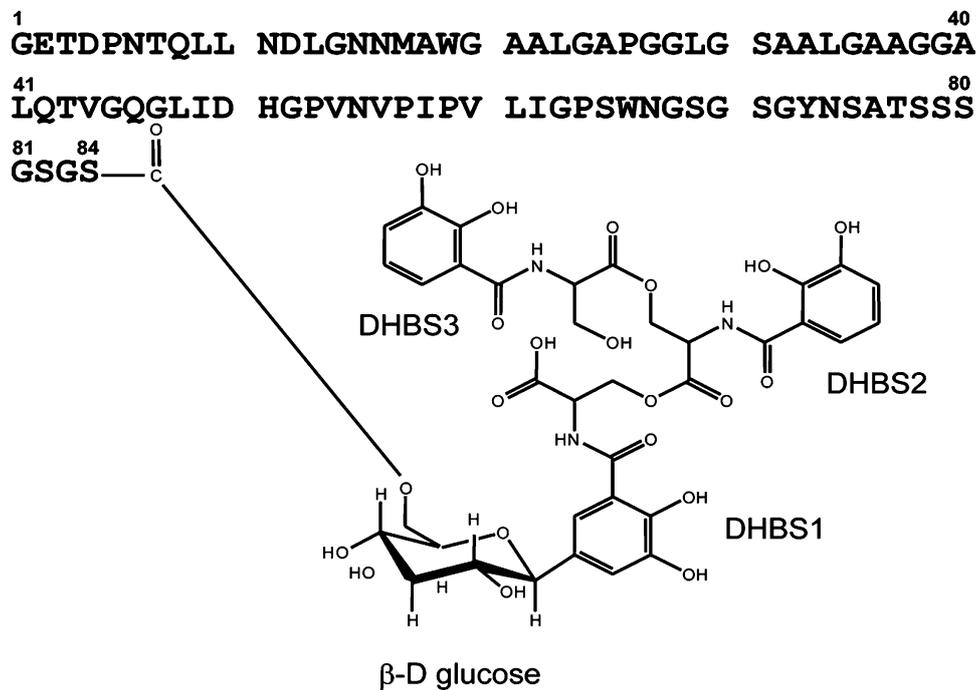
même que le locus *iroA* (**Figure 14**). Les gènes impliqués dans la production des microcines pour la souche 536 sont insérés dans un locus différent (*thrW*), mais toujours avec le locus *iroA* (49). L'îlot sidérophores-microcines de la souche 536 a été considérablement modifié si l'on considère la souche CA46 comme référence : il ne comporte plus que les gènes codant le précurseur peptidique, la protéine d'immunité de la microcine M, le gène *mcmM*, et environ la moitié du gène codant la protéine ABC MchF (9,94). En raison de l'absence de système d'export fonctionnel (association ABC-MFP), il est probable que la souche 536 n'ait pas d'action antagoniste liée à la production de la microcine M.

Les sidérophores-microcines sont donc codés par de véritables îlots génomiques à part entière, fréquemment portés par des îlots génomiques plus grands (ex : *E. coli* Nissle). Ces structures conférant des avantages sélectifs sont acquises par transfert horizontal et peuvent subir de profonds remaniements.

### III. Des gènes à la structure : biosynthèse et régulation

#### 1. Synthèse des sidérophores-microcines

La formule précise des sidérophores-microcines E492 et M a pu être déterminée par analyse chimique en combinant des techniques d'ionisation par électronébulisation, de spectrométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire (89,93). Des plasmides portant chacun des îlots ont été insérés dans des souches de *E. coli* pour réussir à produire des quantités suffisamment importantes sidérophores-microcines. Cette technique n'a pas permis jusqu'à présent d'établir de façon certaine la formule des microcines H47 et I47, faute de production en quantités suffisantes. Par l'étude des systèmes génétiques et grâce à des analyses de spectrométrie de masse, il a été possible de confirmer que les microcines H47 et I47 comportent une entité dérivée de l'entérobactine similaire aux microcines E492 et M (93,101). Les sidérophores-microcines se composent donc d'une entité peptidique reliée par un pont glucidique à un trimère linéaire de DHBS (**Figure 17**).

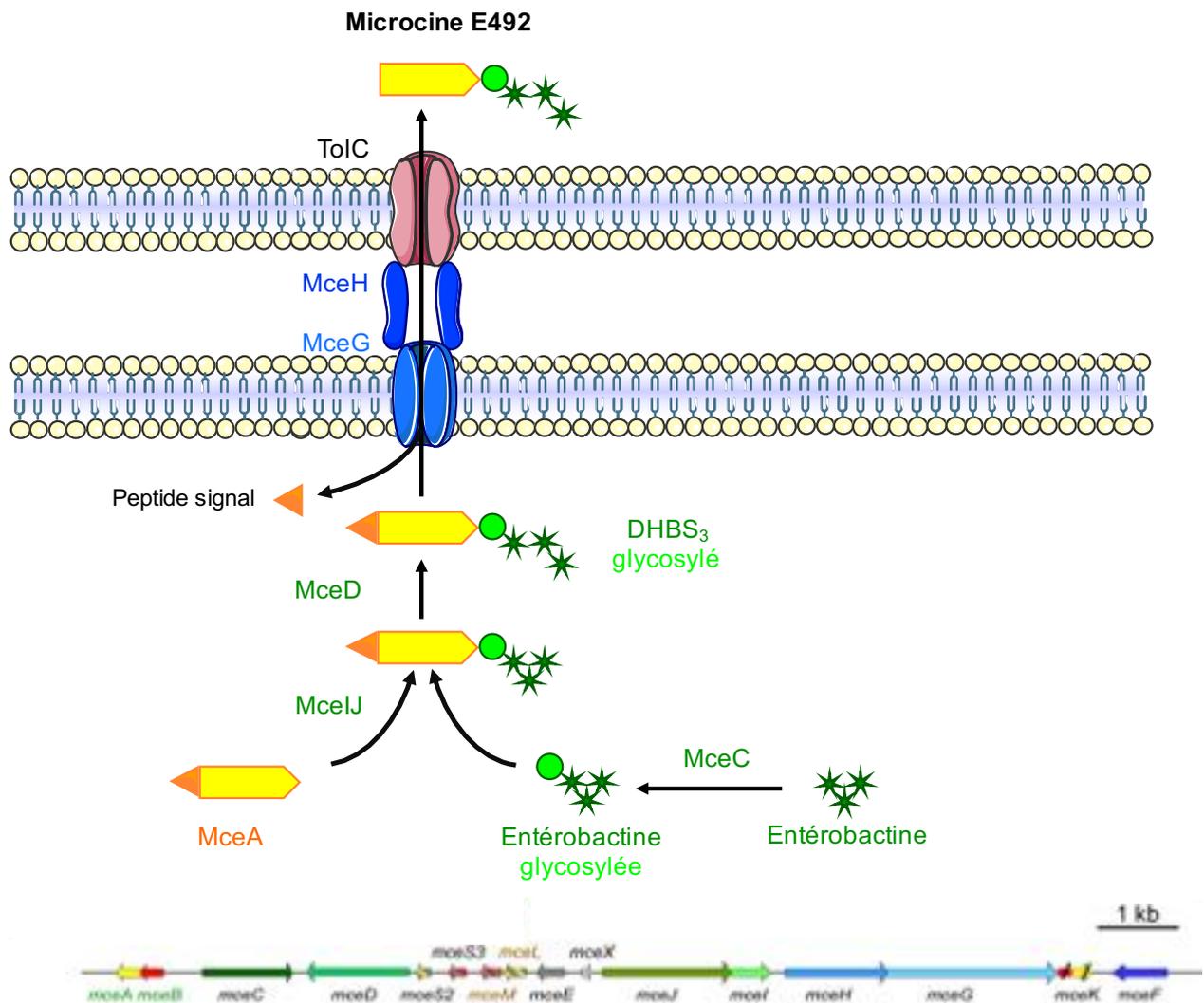


**Figure 17 : Structure de la sidérophore-microcine E492.**

La modification post-traductionnelle portée par la sérine 84 se compose d'un β-D glucose lié à un trimère linéaire de dihydroxybenzoïlsérine (DHBS).

D'après Destoumieux-Garzón *et al.* (102)

Le schéma général de la production des sidérophores-microcines est représenté à la **Figure 18** en prenant l'exemple de la synthèse de la microcine E492 par la souche *K. pneumoniae* RYC492. Il peut être transposé pour les différentes sidérophores-microcines.



**Figure 18** : Schéma général de la synthèse et de l'export de la sidérophore-microcine E492 par *K. pneumoniae* RYC492.

La production des sidérophores-microcines débute d'une part par la synthèse ribosomique des précurseurs peptidiques (MceA, MchB, MchS2 et McMA pour les microcines E492, H47, I47 et M respectivement), et d'autre part par la synthèse d'entérobactine (voir paragraphe III. 4. b. de la section concernant *E. coli* Nissle). Les glucosyltransférases MceC, MchA ou McML catalysent la C-glycosylation d'un (parfois 2) des 3 cycles dihydroxybenzoyl de l'entérobactine (103,104).

Cette entérobactine glycosylée est ensuite liée à la partie C-terminale riche en acide aminé sérine du précurseur peptidique par les protéines MceJ ou leurs homologues MchCD (97). L'entérobactine estérase MceD, MchS1 ou McMK hydrolyse

l'entérobactine en un trimère linéaire de DHBS (103,104). Il a également été envisagé que la linéarisation de l'entérobactine survienne avant la liaison du groupement sidérophore au précurseur peptidique. Aucun des deux schémas n'a pu être réfuté pour la synthèse de la microcine E492 *in vitro*. En effet, les enzymes MceI et MceJ acceptent des formes d'entérobactine glycosylées qu'elles soient linéarisées ou non et l'estérase MceD peut hydrolyser l'entérobactine glycosylée qu'elle soit ou non liée au précurseur peptidique (97,103). De plus, dans des surnageants de cultures, des formes de microcines E492 portant un monomère ou un dimère de DHBS ont été isolées, en plus de la forme majoritaire comportant un trimère de DHBS (104). En revanche, il a été confirmé que la glycosylation de l'entérobactine intervient avant la linéarisation, car cette réaction enzymatique serait très défavorable sur une forme linéarisée (103).

L'étape finale de maturation de la sidérophore-microcine a lieu pendant son export. Le peptide signal N-terminal d'une quinzaine d'acides aminés est clivé par le domaine N-terminal du transporteur ABC (MceG ou MchF) doté d'une activité protéasique (88,93,98). Le rôle de la protéine accessoire (MceH ou MchE) n'est pas clairement établi, mais elle permet probablement de lier le transporteur ABC à la protéine de la membrane externe TolC (88,98).

## **2. Régulation de la biosynthèse des sidérophores-microcines**

A ce jour, aucune étude ne s'est intéressée à la régulation de l'expression des gènes des îlots sidérophores-microcines. Les seules données concernant la régulation de la biosynthèse des sidérophores-microcines se rapportent aux conditions nutritionnelles qui favorisent leur activité antibiotique.

Contrairement à la plupart des métabolites secondaires, les sidérophores-microcines ne sont pas produites uniquement quand les bactéries atteignent la fin de phase exponentielle de croissance / entrent en phase stationnaire. Une étude de l'expression des gènes de la microcine E492 montre qu'elle est produite au cours de la phase exponentielle (105). Les données de cette étude ne permettent pas de conclure quant à la production en phase stationnaire, car du fer avait alors été

ajouté aux milieux de culture. Nous verrons dans la suite de ce paragraphe qu'il s'agit d'un facteur confondant majeur.

La déplétion en glucose ou le changement de source carbonée (ex : utilisation de glycérol) n'augmente pas la production de la microcine E492 (106), ce qui concorde avec une production également en cours de phase exponentielle : la diminution des ressources carbonées ne stimule pas la production de sidérophores-microcines.

Si la source de carbone n'a que peu d'impact sur la production de sidérophores-microcines, il n'en va pas de même pour l'apport protéique. Une meilleure activité antagoniste des surnageants a été observée lorsque la souche productrice de microcine E492 était cultivée dans un milieu contenant de la Bacto tryptone plutôt que des acides casaminés (89,104).

La différence entre ces deux sources protéiques est le mode d'hydrolyse de la caséine. Dans le cas de la Bacto tryptone, l'hydrolyse par la trypsine génère des peptides et peu d'acides aminés libres, alors que l'hydrolyse acide produit uniquement des acides aminés libres dans le cas des acides casaminés (104). Or, les trois acides aminés aromatiques, phénylalanine, tryptophane et tyrosine inhibent la production du chorismate par la voie des shikimates, et par là-même la synthèse d'entérobactine (paragraphe III. 4. b de la section sur *E. coli* Nissle). Ainsi, il a été montré en utilisant des milieux de cultures supplémentés que le tryptophane et la tyrosine limitaient les modifications post-traductionnelles de la microcine E492 en réprimant la biosynthèse de l'entérobactine (104). C'est ce qui explique la diminution d'activité en milieu contenant des acides casaminés. A l'inverse, la phénylalanine n'a aucune influence (104).

Selon un principe similaire, de fortes concentrations en fer dans le milieu environnant inhibent les modifications post-traductionnelles de la microcine E492 (104). La régulation du fer chez de nombreuses bactéries dont *E. coli*, implique la protéine Fur (« ferric uptake regulation »). Lorsque le milieu n'est pas carencé en fer et que la protéine est complexée au fer ferreux, Fur est alors capable de se fixer sur une séquence consensus de 19 paires de bases appelée boîte Fur, ce qui inhibe la transcription du gène situé en aval. L'expression de très nombreux gènes est ainsi régulée, parmi lesquels les gènes responsables de la synthèse de l'entérobactine (69,70). Ainsi, en milieu riche en fer, les modifications post-traductionnelles des microcines sont inhibées.

Par ailleurs, dans le système de synthèse de la microcine H47, une boîte Fur se trouve en amont du gène *mchX* et cause l'inhibition de sa transcription en présence de fer (9). Cependant, le rôle de ce gène étant inconnu, les conséquences d'une forte concentration en fer sur le système de production de la microcine H47 restent méconnues (hors interférence avec la synthèse d'entérobactine).

Ainsi, les principaux paramètres qui interfèrent avec la biosynthèse des sidérophores-microcines sont la présence d'acides aminés aromatiques et une forte concentration en fer qui limitent la synthèse d'entérobactine, et par là-même les modifications post-traductionnelles.

#### **IV. Mécanismes d'action**

Les sidérophores-microcines sont des peptides antimicrobiens sécrétés par la bactérie productrice (*E. coli* ou *K. pneumoniae*) dans le milieu extérieur. Elles présentent une activité bactéricide contre des bactéries phylogénétiquement proches. Elles n'ont pas d'activité contre les champignons (*Fusarium* ou *Candida*) (107), ni contre les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus*, *Micrococcus* ou *Bacillus*). Toutes présentent un effet antibiotique contre des souches de *E. coli*. Les microcines H47 et E492 sont actives contre des souches de *S. enterica* Typhimurium et *S. enterica* Enteritidis, mais seule la microcine H47 semble présenter une activité contre *K. pneumoniae* et *E. cloacae* (89,93,107).

Par conséquent, les sidérophores-microcines ciblent plutôt les entérobactéries susceptibles d'occuper les mêmes niches écologiques que la bactérie productrice. Cependant le panel de bactéries cibles testées reste faible et ne comprend souvent qu'une seule souche par espèce (89,93,107). Il conviendrait donc d'accroître le nombre de bactéries testées comme cibles potentielles afin de préciser le spectre antibactérien des sidérophores-microcines.

Pour exercer leur activité antibiotique sur une bactérie cible, les sidérophores-microcines doivent être préalablement internalisés. Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons tout d'abord à leur capture par les bactéries cibles, puis à leur mode d'action toxique.

## 1. Capture par la bactérie cible

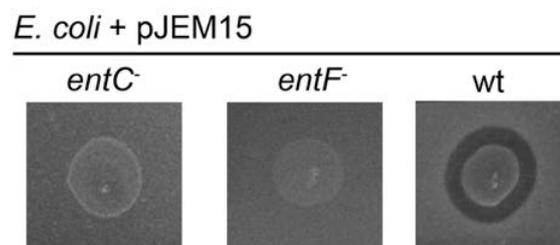
Des expériences de mutagénèse dans des souches de *E. coli* ont montré que l'entrée des microcines E492, H47 I47 et M dans la bactérie cible passait par une interaction avec les récepteurs FepA, Fiu et Cir (9,93). Pour rappel, ces 3 récepteurs reconnaissent la DHBS, mais seul FepA interagit avec l'entérobactine (paragraphe III. 4. c. du chapitre concernant *E. coli* Nissle). Une souche dépourvue de Fiu ou Cir présente la même sensibilité aux sidérophores-microcines qu'une souche sauvage (93). Par contre, une souche mutée pour FepA présente une moindre sensibilité, qui est accrue pour un double mutant *fepAfiu* ou *fepAcir*. Mais seule une souche de *E. coli* dépourvue des 3 récepteurs FepA, Cir et Fiu est totalement résistante (9,93), ce qui indique que les sidérophores-microcines peuvent utiliser les 3 récepteurs pour entrer dans le périplasme, même si FepA semble avoir un rôle prédominant. De même, chez *Salmonella*, c'est le récepteur IroN des salmochélines et DHBS qui est le récepteur principal des sidérophores-microcines, suivi par Cir et FepA (9).

Le mode d'action des sidérophores-microcines a ainsi été qualifié de « Cheval de Troie » (74,108) : elles pénètrent dans la bactérie cible en utilisant les récepteurs spécifiques des sidérophores grâce à leur modification post-traductionnelle par un groupement dérivé de l'entérobactine. A ce titre, une sidérophore-microcine « non modifiée », c'est à dire dépourvue de groupement dérivé de l'entérobactine ne devrait pas pouvoir pénétrer dans la bactérie cible et serait donc inactive. La littérature concernant l'activité éventuelle des sidérophores-microcines non modifiées est cependant contradictoire.

Une forme de microcine E492 non modifiée a pu être purifiée à partir de cultures en milieu contenant des acides aminés casaminés (inhibant la production d'entérobactine, voir paragraphe III. 2. précédent) comme source d'acides aminés. Son activité antibiotique a été comparée à celle de la forme modifiée. La forme modifiée est active sur davantage d'espèces bactériennes : *E. cloacae* et *K. pneumoniae* en plus de *E. coli* et *S. enteritidis*. De plus, les concentrations minimales inhibitrices sont 2 à 8 fois plus faibles avec la forme modifiée. La modification post-traductionnelle de la microcine E492 augmente donc sensiblement son activité antibiotique, mais la microcine non modifiée est décrite comme ayant une activité antibiotique intrinsèque (89,102).

Une limite de ces études est qu'elles font appel à des formes purifiées et concentrées de microcines E492. Les concentrations testées pour établir la sensibilité aux microcines E492 modifiées ou non sont de 0,02 à 10  $\mu$ M (89). Aucune donnée n'existe concernant les concentrations de microcines E492 synthétisées physiologiquement par la souche *K. pneumoniae* RYC492, et encore moins concernant les concentrations atteintes dans l'environnement immédiat des bactéries cibles. Il est donc difficile d'extrapoler l'activité *in vivo* d'une microcine à partir d'une concentration minimale inhibitrice qui est peut-être supra-physiologique. D'autre part, la microcine E492 non modifiée n'a aucune similarité structurelle évidente avec les sidérophores de la famille des catécholates qui pourrait expliquer qu'elle soit reconnue par les récepteurs spécifiques FepA, Fiu et Cir. Elle pourrait toutefois adopter une conformation tridimensionnelle lui permettant d'être reconnue par ces récepteurs (108).

Par ailleurs, cette interprétation d'une activité antibiotique de la microcine E492 non modifiée est contredite par une étude de l'activité antagoniste d'une souche porteuse de l'îlot microcine E492, mais incapable de produire de l'entérobactine. En effet, une souche de *E. coli* porteuse de l'îlot microcine E492 mais mutée pour *entC* ou *entF* produit une microcine E492 non modifiée, mais n'exerce pas d'effet antagoniste sur une bactérie cible (**Figure 19**) (109). L'activité antibiotique est évaluée en mettant en contact une goutte de concentration calibrée en bactérie productrice de microcines avec un tapis de bactéries sensibles. L'effet antagoniste est déterminé par la mesure du diamètre du halo d'inhibition éventuel autour de la bactérie productrice. Ce test se rapproche davantage des conditions *in vivo* de compétition entre les deux bactéries.



**Figure 19 : Production de microcine E492 inactive par des bactéries portant des mutations dans les gènes de synthèse de l'entérobactine.**

Des aliquots de cultures liquides de souches de *E. coli* sauvage (wt), dépourvue du gène *entC* (*entC*-) ou *entF* (*entF*-) portant le système de production de la microcine E492 (pJEM15) ont été déposés sur un tapis de bactéries sensibles (*E. coli* BL21). L'activité est évaluée par les diamètres des halos d'inhibition de croissance. D'après Mercado G. *et al.* (109)

Des résultats similaires ont été obtenus avec des souches portant l'îlot microcine E492 mutées pour les gènes responsables des modifications post-traductionnelles *mceC*, *mceI* ou *mceJ* : ces souches perdent leur capacité à former un halo d'inhibition de croissance sur un tapis de bactéries sensibles (95). Ainsi, une souche incapable de modifier la microcine E492 après la traduction perd son activité antagoniste. Une observation similaire avait été réalisée concernant l'absence d'activité antibiotique d'une souche portant l'îlot microcine H47 mais incapable de synthétiser de l'entérobactine (101).

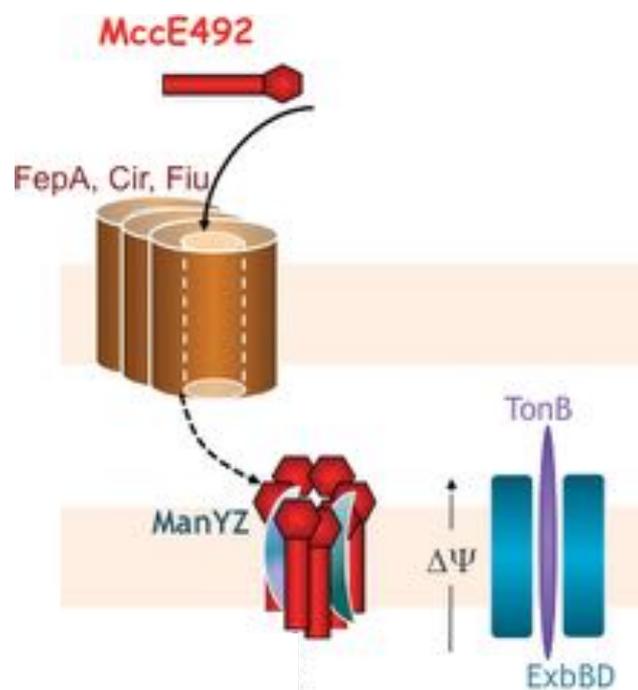
La question de l'activité éventuelle des formes de microcines E492, H47, I47 et M dépourvues de modification post-traductionnelle reste donc sans réponse définitive. Un élément décisif pourrait être l'étude de l'interaction entre ces microcines et les récepteurs FepA, Fiu et Cir (étude cristallographique par exemple) de façon à établir les groupements clés dans cette reconnaissance. Néanmoins, il est établi que la modification post-traductionnelle avec un groupement sidérophores augmente considérablement l'effet antibiotique des microcines.

## **2. Cibles cellulaires**

Si les sidérophores-microcines sont toutes internalisées dans le périplasme de la bactérie cible grâce aux récepteurs FepA, Fiu et Cir, le mécanisme de leur activité toxique et leurs cibles cellulaires diffèrent. Seules deux sidérophores-microcines ont été étudiées à cet égard, les microcines E492 et H47.

Le mécanisme d'action de la sidérophore-microcine E492 a été le plus abondamment étudié. Elle exerce son activité bactéricide en formant des canaux sélectifs des cations dans la bicouche lipidique de la membrane interne, ce qui induit à la fois une perméabilisation et une dépolarisation de cette membrane interne (110). Comme la microcine E492 est une petite protéine, il a été rapidement suspecté qu'elle ne puisse pas former seule un canal dans la membrane interne, mais qu'elle s'associe avec des protéines de la bactérie cible pour créer une structure toxique.

Un rôle du complexe protéique TonB/ExbB/ExbD enchâssé dans la membrane interne a été étudié. Pour rappel, il est impliqué dans le transfert l'énergie de la force protomotrice de la membrane interne vers la membrane externe permettant notamment la capture des sidérophores par les récepteurs FepA, Fiu et Cir (voir paragraphe III. 4. c. du chapitre concernant *E. coli* Nissle). Une souche déficiente pour TonB devient résistante à la sidérophore-microcine E492 (90,93,107). Cependant, le rôle de TonB n'est pas ici de fournir l'énergie nécessaire à l'internalisation de la microcine. En effet, une souche déficiente pour TonB mais dont la membrane interne a été perméabilisée pour permettre l'entrée de la microcine E492 dans le périplasm est résistante à l'effet antibiotique (95). D'autre part, une souche mutée uniquement pour la partie périplasmique de TonB qui interagit avec les récepteurs FepA, Fiu et Cir reste sensible à la sidérophore-microcine E492 (111). La conclusion de ces deux études est que TonB intervient dans l'ancrage de la microcine E492 dans la membrane interne ou la dépolarisation subséquente (**Figure 20**) (95,107,111).



**Figure 20 : Mode d'action de la microcine E492.**

La microcine E492 est reconnue par les récepteurs des sidérophores de la famille des catécholates FepA, Cir et Fiu. Une fois dans le périplasm, elle s'intègre dans la membrane interne et interagit avec le complexe ManYZ de la perméase du mannose et TonB. Cela entraîne une perméabilisation de la membrane aux cations et une dépolarisation ( $\Delta\Psi$ ). D'après Rebuffat S. (112)

A l'inverse, une délétion de ExbB et ExbD est sans effet sur la sensibilité aux sidérophores-microcines (le test ayant été également réalisé pour les microcines H47 et M), probablement en raison d'une suppléance par les protéines TolQ et TolR, dont il avait été déjà montré qu'elles pouvaient compléter ExbB et ExbD en ce qui concerne la sensibilité de souches de *E. coli* à certaines colicines (93,107).

Par ailleurs, il a été montré par des expériences de mutagenèse, que le complexe protéique enchâssé dans la membrane interne ManY-ManZ est nécessaire pour la sensibilité à la microcine E492. Ce complexe a été initialement décrit avec la protéine cytoplasmique ManX pour former la perméase du mannose, impliqué dans l'internalisation du mannose et autres hexoses. La dépolarisation de la membrane interne en réponse à la microcine E492 n'est plus observée chez une souche mutante pour ces deux protéines ManY-ManZ, qui est d'ailleurs totalement résistante (**Figure 20**) (113). Dans cette étude, il a été également démontré que la partie C-terminale du précurseur peptidique MceA n'était impliquée que dans la reconnaissance de la microcine par les récepteurs de la membrane externe (*via* le couplage avec l'entité sidérophore). Elle n'est pas nécessaire pour l'insertion dans la membrane interne, ni pour l'activité toxique (113).

Le mode d'action de la sidérophore-microcine H47 a été étudié en utilisant l'ilot génomique de la souche *E. coli* H47. Il a tout d'abord été observé qu'une souche n'exprimant que le gène codant le précurseur peptidique MchB n'était pas viable, par phénomène d'auto-toxicité. Cependant, certains clones présentant des mutations de l'ATP synthase étaient capable de pousser (114). Des expériences de mutagenèses et complémentations ont ensuite prouvé que la structure nécessaire pour l'activité antibactérienne de la microcine H47 était la pompe à protons  $F_0$  de l'ATP synthase et non pas l'unité catalytique  $F_1$  (115). Il est supposé que la microcine H47 provoquerait l'entrée non régulée de protons en interagissant avec la pompe  $F_0$ .

Comme pour la microcine E492, la protéine TonB est essentielle à la sensibilité de la bactérie cible à la microcine H47 (93,114). Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à l'intervention précise de cette protéine dans l'activité toxique de la sidérophore-microcine : permet-elle le transfert d'énergie nécessaire à l'internalisation de la sidérophore-microcine H47, ou permet-elle son activité toxique après l'internalisation comme pour la microcine E492 ?

### 3. L'énigme *E. coli* Nissle

*E. coli* Nissle, comme les souches CFT073 et ABU83972 possède un îlot sidérophores-microcines tronqué, dépourvu des gènes *mcmL/mchA* et *mcmK/mchS1* (**Figure 16**). Des gènes homologues, *iroB* et *iroD* respectivement, sont présents sur le même îlot génomique I (**Figure 14**) (9,94), mais leur rôle dans la synthèse des microcines H47 et M de *E. coli* Nissle n'a jamais été étudié.

Par ailleurs, l'analyse par spectrométrie de masse de surnageants de cultures de *E. coli* Nissle a révélé la présence d'ions de *m/z* correspondant uniquement aux précurseurs peptidiques des microcines M et H47. En l'absence de certains gènes impliqués dans les modifications post-traductionnelles, il est donc suspecté que *E. coli* Nissle ne synthétise pas de sidérophores-microcines *stricto sensu*, mais seulement des microcines non modifiées. Les protéines IroB et IroD ne suppléeraient donc pas l'absence de MchL et MchK (93).

Cette hypothèse de la production de microcines non modifiées par *E. coli* Nissle est à l'origine d'un paradoxe. En effet, comme nous l'avons mentionné dans le paragraphe IV. 1. de cette section concernant les sidérophores-microcines, la sidérophore-microcine H47 a besoin, pour exercer une activité antibiotique d'être couplée à un dérivé de l'entérobactine. Une souche *E. coli* H47 incapable de produire ce sidérophore perd son activité, sans que la synthèse du précurseur MchB soit affectée (101). La microcine H47 non modifiée de *E. coli* Nissle serait donc inactive. Aucune donnée ne permet de statuer quant à l'activité d'une microcine M non modifiée. Or, dans un test d'activité antagoniste utilisant une souche sensible à l'effet des sidérophores-microcines H47 et M, seul un plasmide portant les 2 gènes d'immunité *mchI* et *mcml* protège de l'activité antibiotique de *E. coli* Nissle (9). La microcine H47 produite par *E. coli* Nissle possède donc une activité antagoniste.

Une explication à ce paradoxe, serait que *E. coli* Nissle produit bien des sidérophores-microcines mais que les techniques d'analyses chimiques sont prises en défaut pour leur caractérisation, d'autant plus que les concentrations produites sont probablement très faibles (93). Cette question de la synthèse de sidérophores-microcines par *E. coli* Nissle sera au cœur du travail expérimental de cette thèse.

## L'îlot *pks*

L'îlot *pks* porté notamment par la souche *E. coli* Nissle a été caractérisé pour la première fois au sein du laboratoire « Pathogénie et commensalisme des entérobactéries » (11). Dans cette partie, nous aborderons tout d'abord le rôle de cet îlot génomique dans la synthèse de la colibactine et les conséquences de la production de cette génotoxine. Puis nous envisagerons les rôles plus récemment décrits de l'îlot *pks* dans la production d'autres métabolites secondaires.

### I. Généralités

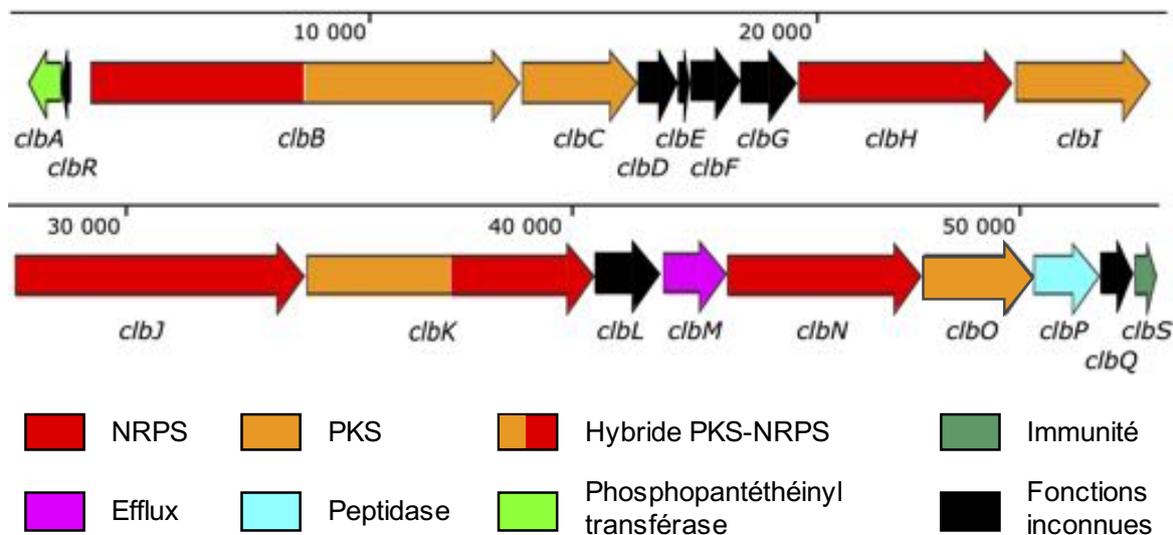
#### 1. Le système génétique de l'îlot *pks*

L'îlot *pks* est un îlot génomique de 54 kilobases (kb) renfermant 19 gènes (de *clbA* à *clbS*) (**Figure 21**). Ces derniers codent la chaîne d'assemblage de type PKS-NRPS qui synthétise la colibactine. Cette machinerie renferme (11,116,117) :

- une PPTase : ClbA
- trois PKS : ClbC, ClbI et ClbO
- trois NRPS : ClbH, ClbJ et ClbN
- deux hybrides PKS-NRPS : ClbB et ClbK
- une pompe à efflux : ClbM (118)
- les enzymes accessoires ClbD, ClbE, ClbF, ClbG, ClbL et ClbQ
- une protéine supposément impliquée dans la régulation et possédant un motif de liaison à l'ADN : ClbR
- une protéine de résistance à l'activité génotoxique de la colibactine : ClbS (119)

Trois gènes codant des transposases et un codant une intégrase flanquent l'îlot *pks*, témoin de la mobilité passée de l'îlot génomique (11).

L'étude de la transcription de l'îlot *pks* par RT-PCR a révélé sept transcrits, dont quatre polycistroniques. Ces polycistrons comprennent les gènes *clbC* à *clbG* (6,3 kb), *clbI* à *clbN* (23,3 kb), *clbO* à *clbP* (3,9 kb) et *clbR* à *clbA* (0,9 kb) (120).



**Figure 21 : L'îlot *pks***

D'après Taïeb F. *et al.* (116)

## 2. Distribution de l'îlot *pks*

Au sein de l'espèce *E. coli*, l'îlot *pks* a été quasi exclusivement retrouvé dans des souches du phylogroupe B2 (11,121,122). Il est absent des souches K12 de laboratoire et des souches pathogènes intestinales (122). Il a également été mis en évidence dans des souches européennes de *K. pneumoniae* (3,5%, n=141), *Enterobacter aerogenes* (27,3%, n=11) et *Citrobacter koseri* (n=1). La séquence de l'îlot *pks* est très conservée parmi ces entérobactéries (98% d'identité de séquences nucléotidiques) (122). Fait intéressant, il semble y avoir des disparités géographiques importantes dans la prévalence de l'îlot *pks* parmi les souches de *K. pneumoniae*. En effet, près de 17% des isolats cliniques taiwanais de *K. pneumoniae* hébergent cet îlot (n=400) (123). La prévalence de l'îlot *pks* atteint 25% des souches de bactériémies à *K. pneumoniae* en Chine (124) et à Taïwan (125). Ceci est probablement lié à la surreprésentation de l'îlot *pks* dans le sérotype hypervirulent K1 qui est le plus fréquent dans ces pays, mais minoritaire en Europe.

Des homologues de l'îlot *pks* ont également été découverts dans les génomes d'une souche de *Pseudovibrio* isolée de coraux (126) et de *Frischella perrara*, bactérie commensale du tube digestif de l'abeille (127).

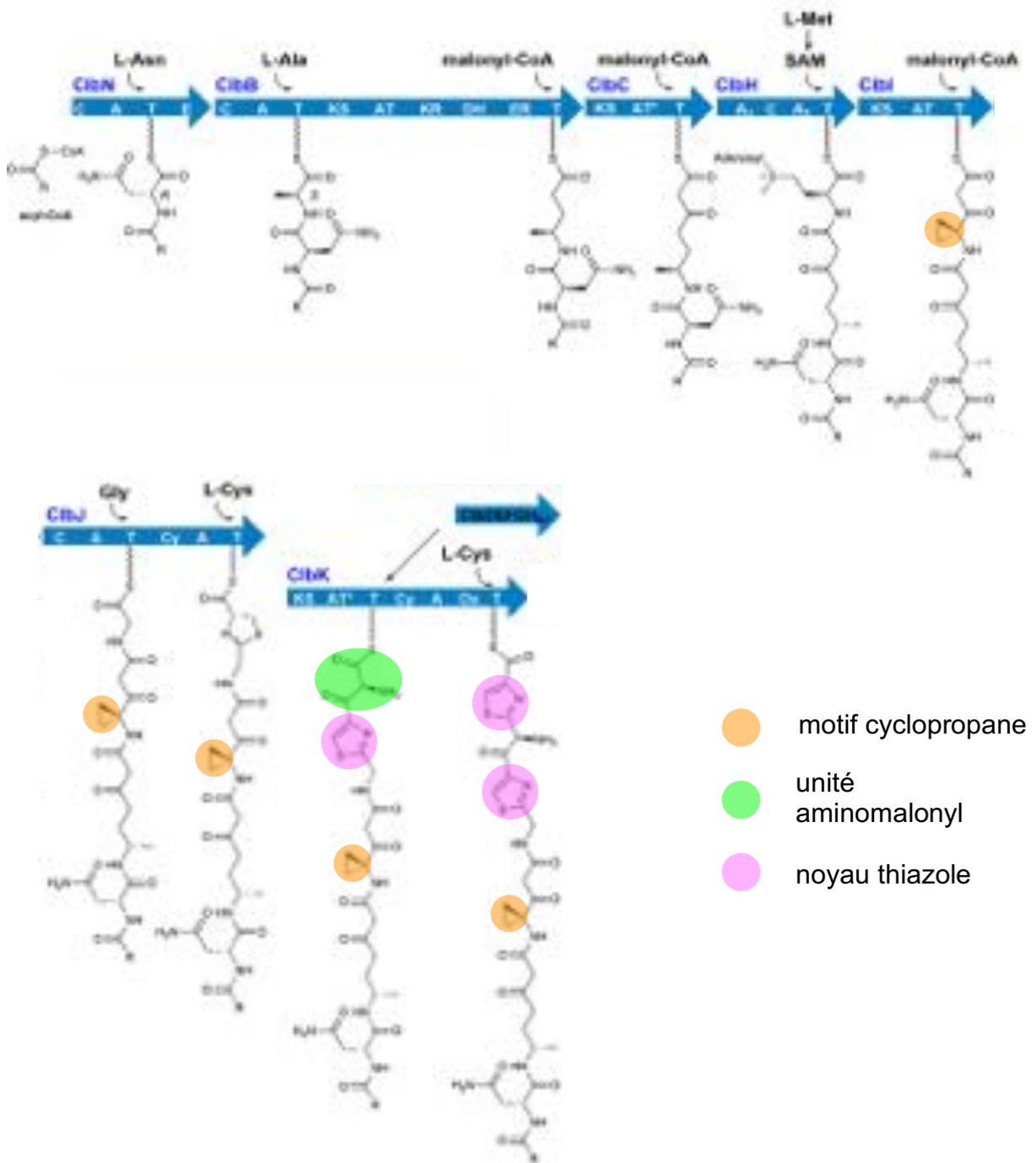
Dans les souches de *E. coli* du phylogroupe B2, l'îlot *pks* est inséré au niveau du locus *asnW*. Il est toujours retrouvé à proximité du HPI situé au locus *asnT* permettant la synthèse de yersiniabactine (la réciproque n'est pas vraie) (11,122). De 12 à 33% des souches de *E. coli* isolées de selles d'adultes ou d'enfants portent l'îlot *pks* (11,121,128,129), alors que près de 50% des souches fécales appartiennent au phylogroupe B2 dans les pays industrialisés (7). A trois jours de vie, environ 15% des nouveaux-nés sont porteurs d'une souche hébergeant l'îlot *pks* (130). Outre ce portage asymptomatique, l'îlot *pks* est présent dans près de 40% des souches d'ExPEC (121) et dans 30 à 50% des souches de *E. coli* responsables d'urosepsis (129,131).

## II. Synthèse de la colibactine

La colibactine est un composé de type PK-NRP produit par une machinerie complexe sous la forme d'une précolibactine non génotoxique qui est activée par clivage de son motif N-terminal dans le périplasme (132,133). Le processus de synthèse de la précolibactine n'est pas totalement élucidé. La **Figure 22** représente un des derniers modèles proposés.

La synthèse de précolibactine requiert tout d'abord l'activation des enzymes PKS et NRPS par la PPTase ClbA. La NRPS ClbN utilise ensuite l'asparagine et pour générer le motif « prodroque » N-myristoyl-D-asparagine. ClbB ajoute une L-valine ou L-alanine puis incorpore un groupement malonylCoA (133,134). La synthèse se poursuit par l'ajout successif de malonylCoA ou d'acides aminés par les différents modules de la chaîne d'assemblage ClbC, ClbH, ClbI, ClbJ et ClbK. ClbH et ClbI permettent la formation du motif cyclopropane par l'incorporation de l'acide aminé non protéinogène S-adénosylméthionine (135–137).

En parallèle, ClbD, ClbE, ClbF et un domaine A de ClbH génèrent une unité inhabituelle, l'aminomalonyl que ClbG transfère à ClbK pour incorporation à la colibactine en cours de synthèse (138,139). Il est à noter que ClbG peut transférer des unités aminomalonyl à toutes les enzymes PKS de la chaîne d'assemblage, ce qui suggère que ce motif pourrait être retrouvé plusieurs fois dans la colibactine finale (139,140).



**Figure 22 : Modèle de biosynthèse de la précolibactine**

Modifié d'après Shine E. *et al.* (141)

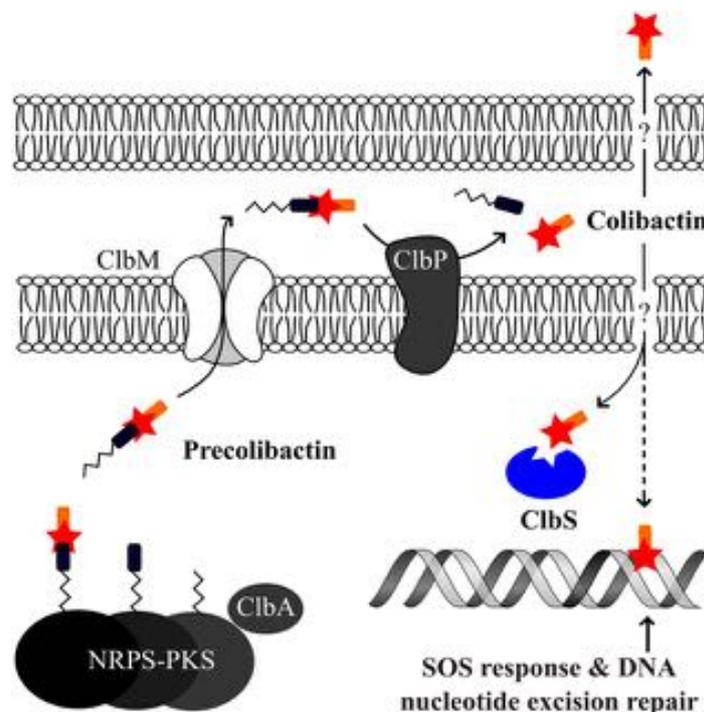
La dernière étape majeure dans la synthèse de la précolibactine est l'incorporation des 2 noyaux thiazoles. La NRPS ClbJ intègre un groupement thiazoline à partir de la L-cystéine. Le domaine oxydase de ClbK le convertit en thiazole et greffe un second groupement thiazole à partir de la L-cystéine (142,143).

Les rôles de ClbL, ClbO et ClbQ n'ont pas encore été élucidés. Il a été proposé que la PKS ClbO ajoute un nouveau groupement aminomalonyl (139–141). Une

analyse *in silico* révèle que ClbL est une amidase, mais son rôle précis reste inconnu (11). ClbQ pourrait être une thioestérase de type II impliqué dans la libération de la précolibactine. Cependant, elle ne libérerait pas seulement la précolibactine finale, mais également des formes intermédiaires (140).

La structure finale de la précolibactine produite par la chaîne d'assemblage demeure inconnue. Ce métabolite inactif est exporté dans le périplasme par le transporteur ClbM de type « multidrug and toxic compound extrusion » (MATE) (118).

La maturation en colibactine est alors assurée par la peptidase ClbP qui clive le motif N-myristoyl-D-asparagine. Le site catalytique N-terminal de cette peptidase est périplasmique et il est ancré à la membrane interne par trois hélices transmembranaires (132,144). Ces dernières sont indispensables à l'activité catalytique, probablement car elles assurent une conformation tridimensionnelle adéquate du site enzymatique (133,144). Cette activation de la précolibactine en colibactine, à l'extérieur du cytoplasme est probablement un système de protection de la bactérie sécrétrice contre des phénomènes d'auto-toxicité (**Figure 23**) (133). Les modalités d'export de la colibactine hors de la membrane externe restent inconnues.



**Figure 23 : Protection de la souche productrice de colibactine contre l'auto-toxicité**

D'après Bossuet-Greif N. *et al.* (119)

La protéine ClbS confère une résistance à la bactérie productrice de colibactine (**Figure 23**). D'ailleurs, ClbS protège à la fois les cellules eucaryotes et procaryotes de l'activité génotoxique de la colibactine (119). Cette enzyme séquestre la colibactine (119) et ouvre le noyau cyclopropane essentiel à l'effet génotoxique, donnant naissance à des produits inoffensifs (145).

### III. Impacts de la colibactine

#### 1. Relation structure-activité

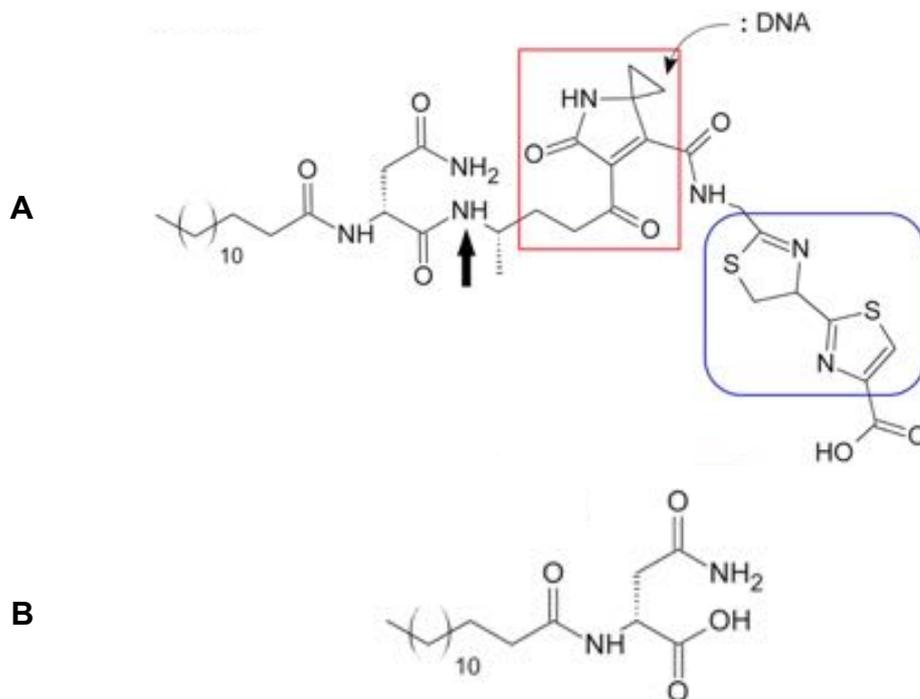
Plus de dix ans après sa première description et malgré les travaux de plusieurs équipes de biochimistes, la structure exacte de la colibactine n'est pas encore élucidée. L'isolement et la caractérisation de ce composé posent de nombreux problèmes. En effet, l'activité génotoxique liée à la colibactine n'est pas observée si des cellules sont exposées à des surnageants de culture ou des lysats de bactéries productrices (11), ce qui indique que cette molécule est probablement instable. La nécessité d'un contact direct bactérie-cellule eucaryote pour l'effet génotoxique de la colibactine serait également expliquée par sa mauvaise diffusion au travers des membranes cellulaires (11,141).

Pour obtenir des informations sur la structure de la colibactine, des métabolites produits par des souches mutantes pour un gène de l'îlot *pks* ont été analysés. L'inactivation d'un gène dans la chaîne de biosynthèse entraîne l'accumulation des métabolites en amont de la mutation en quantité suffisante pour permettre leur étude. Le plus souvent, il s'agit de précolibactines moins instables que la colibactine active, issues de mutants dépourvus de la peptidase ClbP (134,137,139,140,142,143,146,147). Ces analyses ont abouti à la caractérisation d'intermédiaires de synthèse de structures variées, si bien que les auteurs s'accordent désormais pour parler de colibactines. « La » colibactine serait un mélange de composés réactifs partageant des structures-clés, plutôt qu'une molécule de structure unique (141,147,148).

Deux groupements déterminants pour l'activité génotoxique des colibactines ont été identifiés. Tout d'abord, le noyau spiro-cyclopropane électrophile (**Figure 24**) est à l'origine d'une probable alkylation de l'ADN conduisant à la formation d'adduits et de

ponts inter-brins d'ADN (135,148). Ces ponts ont été mis en évidence par interaction directe entre de l'ADN et une précolibactine possédant un noyau spiro-cyclopropane (146) ou des bactéries possédant l'îlot *pks* (149). La formation de ponts inter-brins d'ADN a également été observée dans des cellules eucaryotes mises en contact de souches possédant l'îlot *pks* (149).

L'autre groupement-clé est le motif bi-thiazole (**Figure 24**), dont il est suspecté qu'il pourrait être un intercalant de l'ADN, par analogie avec le noyau bi-thiazole de la bléomycine (142,143).



### **Figure 24 : Modèle de précolibactine supposé**

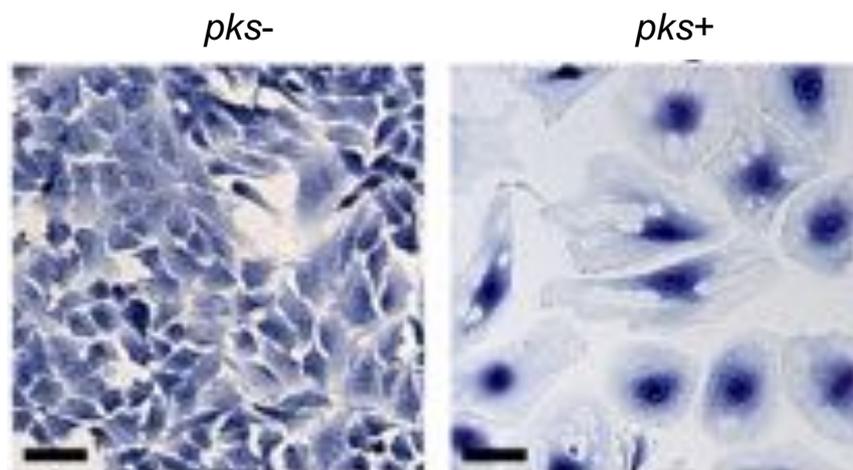
L'action de la peptidase ClbP (site de clivage figuré par une flèche) sur une précolibactine supposée (A) conduit à la libération de N-myristoyl-D-asparagine (B) et de colibactine active possédant deux groupements déterminants pour son activité : le spiro-cyclopropane (encadré en rouge) et le noyau bi-thiazole (encadré en bleu). D'après Taïeb F. *et al.* (116)

La mise en évidence de la formation d'adduits et de ponts inter-brins de colibactine à l'ADN a ouvert la voie à une nouvelle méthode d'étude pour tenter d'élucider la structure de la (ou des) colibactine(s). Il ne s'agit plus d'étudier des précolibactines par l'intermédiaire de mutants de l'îlot *pks*, mais de caractériser les dérivés de la colibactine liés à l'ADN (148,150). Ces derniers sont probablement plus similaires aux colibactines produites physiologiquement que les métabolites précédemment étudiés, ce qui permettra peut-être à terme d'élucider la structure des colibactines.

## 2. Phénotypes associés

Dans des cellules eucaryotes infectées par des bactéries porteuses de l'îlot *pks*, la liaison de la colibactine à l'ADN aboutit à la formation de ponts inter-brins d'ADN, puis de cassures de l'ADN double-brin (149). Ces cassures, tout comme les adduits à l'ADN ont été observées à la fois dans des lignées cellulaires *in vitro* (11,149) et dans des modèles murins de colonisation digestive (150,151). Ces dommages à l'ADN entraînent l'activation de la voie de signalisation ATM-Chk2-Cdc25, ce qui conduit à une phosphorylation de l'histone H2AX et un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M (11).

Les conséquences pour les cellules infectées dépendent du nombre de cassures double-brin. Une quantité massive entraîne un arrêt irréversible du cycle cellulaire et une mort par apoptose (11,151). En cas de dommages plus faibles, l'arrêt du cycle cellulaire s'accompagne d'un phénomène de sénescence qui se traduit phénotypiquement par un agrandissement des cellules appelé mégalyocytose (**Figure 25**) (11). Ces cellules présentent un profil sécrétoire associé à la sénescence (SASP pour « senescent associated secretory profile »), c'est à dire qu'elles libèrent des cytokines pro-inflammatoires, des facteurs de croissance, des radicaux libres oxygénés et des protéases (152,153).



**Figure 25 : Effet cytopathique de la colibactine : la mégalyocytose**

Des cellules HeLa sont infectées transitoirement avec une souche productrice de colibactine grâce à un chromosome bactérien artificiel portant l'îlot *pks* (*pks+*) ou une souche portant le chromosome artificiel vide (*pks-*). Elles sont ensuite lavées et incubées avec de la gentamicine pendant 72h avant d'être colorées au Giemsa. D'après Nougayrède JP *et al.* (11)

Pour une charge bactérienne compatible avec ce qui est observé *in vivo* pour la colonisation par une bactérie commensale, les cassures sont rapidement corrigées par des systèmes de réparation de l'ADN et le cycle cellulaire reprend. Cependant, une fraction de ces cellules conserve des dommages à l'ADN qui se traduisent par une instabilité chromosomique et une augmentation de la fréquence des mutations génétiques. Ces dernières peuvent conduire à une transformation oncogénique (151).

### **3. Conséquences en santé humaine**

#### **a. Colibactine et cancer**

Dans les pays industrialisés, le portage intestinal de souches hébergeant l'îlot *pks* s'élève de 12 à 33% (voir paragraphe I. 2.). Comme celles-ci peuvent causer une instabilité génétique suite aux dommages à l'ADN qu'elles induisent, la question d'un lien entre colibactine et cancer, en particulier cancer colorectal, s'est rapidement posée (11,151). L'étude de biopsies montre la présence de souches de *E. coli* porteuses de l'îlot *pks* chez 55 à 67% des patients atteints de cancer colorectal, contre moins de 20% de souches *pks+* chez les patients contrôles (14,15).

Dans un modèle de souris axéniques, des souches productrices de colibactine contribuent à la survenue d'un cancer colorectal dans un contexte inflammatoire (14). Au niveau mécanistique, le SASP induit par la colibactine peut favoriser la croissance des cellules tumorales par sécrétion de facteur de croissance hépatocytaire (153). La prolifération cellulaire induite par la sécrétion de facteurs de croissance ne concerne pas seulement les cellules infectées, mais également les cellules non infectées avoisinant les cellules sénescents suite à l'infection (154).

S'il a été montré que dans des modèles murins prédisposés au cancer colorectal, des souches porteuses de l'îlot *pks* aggravent la sévérité de la pathologie (14,153,155,156), aucune donnée expérimentale ne suggère que de telles bactéries pourraient induire spontanément des cancers colorectaux. En effet, dans un modèle de colonisation prolongée de rats par des souches *pks+*, une augmentation de l'apoptose des cellules épithéliales intestinales compensée par un accroissement de la prolifération cellulaire a été observée, mais aucun cancer spontané n'a été rapporté (130).

Par ailleurs, dans un modèle de colonisation intestinale de rats, il a été montré que l'exposition au déoxynivalénol, la plus fréquente mycotoxine contaminant les produits céréaliers, augmente la génotoxicité liée aux souches de *E. coli* hébergeant l'îlot *pks*. Cette potentialisation temps- et dose-dépendante n'est pas due à un impact du déoxynivalénol sur la composition du microbiote intestinal, en particulier sur la concentration en *E. coli* (157).

En conclusion, si le simple portage de souches hébergeant l'îlot *pks* ne semble pas suffisant pour causer un cancer colorectal, il a vraisemblablement un rôle « facilitateur » dans des contextes prédisposant à de tels cancers : terrains génétiques, inflammations chroniques ou facteurs environnementaux.

### **b. Îlot *pks* et virulence**

L'îlot *pks* est particulièrement présent dans les souches d'ExPEC et notamment les souches responsables de bactériémies (voir paragraphe I. 2.) ou de méningites néonatales (12). Plusieurs études ont tenté de comprendre le rôle de l'îlot *pks* dans la virulence de ces souches et le développement de ces infections. Dans des modèles animaux, il a été montré que des souches mutées pour un gène de l'îlot et donc incapables de produire de la colibactine ont une capacité de colonisation intestinale altérée. Leur probabilité de translocation dans le compartiment sanguin est également réduite (12,158). Or ces deux étapes de colonisation digestive et de translocation sont des prérequis dans le développement des méningites néonatales causées par *E. coli*.

Dans le compartiment sanguin, l'îlot *pks* contribue à la pathogénicité de la souche en induisant l'apoptose des lymphocytes T et en exacerbant la lymphopénie associée à la septicémie (13). Dans des modèles animaux (rats, souris) de méningites néonatales et de bactériémies, des souches mutées pour un gène de l'îlot et donc incapables de produire de la colibactine sont à l'origine d'une moindre mortalité que les souches portant un îlot intact (12,13).

Si l'îlot *pks* participe à la pathogénicité de certaines souches de *E. coli*, ceci semble également vrai pour les souches de *K. pneumoniae pks+*. Depuis le milieu des années 1980, des souches hypervirulentes de *K. pneumoniae* ont émergé à Taïwan, mais aussi au Japon, au Vietnam et en Corée. Elles causent des infections invasives communautaires telles que des abcès hépatiques, des endophtalmies ou des pneumonies chez des individus sans facteur de risque particulier (159). Ces souches

hypervirulentes sont fréquemment porteuses de l'îlot *pks* (123,125,160). Une étude coréenne récente a montré que le portage de cet îlot pour une souche multi-résistante responsable de bactériémie est un facteur prédictif de mortalité à 30 jours (160).

*K. pneumoniae* est la première cause de méningites communautaires à Taïwan (161). Même si la physiopathologie de ces infections n'est pas totalement élucidée, le site initial de colonisation de ces souches invasives de *K. pneumoniae* semble être le tractus gastro-intestinal (159,161). Il a été montré dans un modèle murin de méningites par colonisation digestive que la mutation de *clbA* dans une souche de *K. pneumoniae* hypervirulente *pks+* aboutissait à une diminution de la translocation digestive, de la quantité de bactéries isolées des différents organes (cerveau, foie, rate, sang) et de la mortalité (161).

En conclusion, l'îlot *pks* contribue à la pathogénicité des souches qui le portent. Néanmoins, ce surcroît de virulence n'est probablement pas exclusivement dû à la colibactine *per se*. En effet, il est désormais établi que l'îlot *pks* intervient dans la synthèse d'autres métabolites et a donc d'autres rôles que la seule synthèse de colibactine.

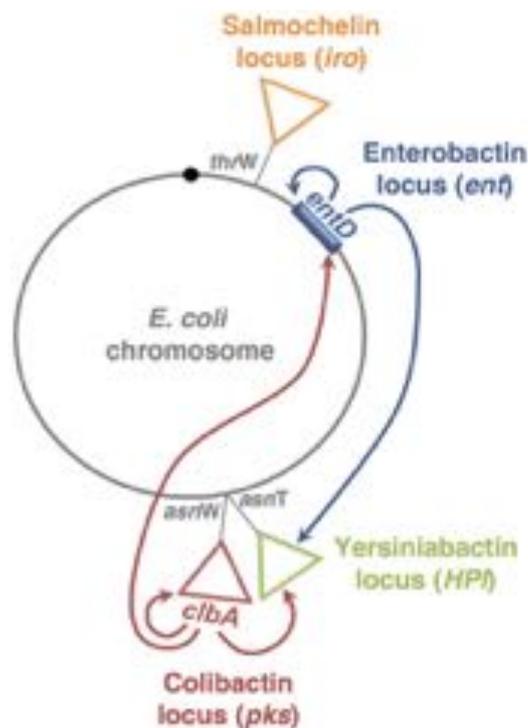
## **IV. Autres rôles de l'îlot *pks***

### **1. La PPTase ClbA et la production de sidérophores**

La première étape dans la biosynthèse de la colibactine est l'activation des PKS et NRPS de la chaîne d'assemblage par la PPTase ClbA (voir paragraphe II.). De même, la PPTase EntD initie la production de l'entérobactine (voir paragraphe III. 4. b. de la section concernant *E. coli* Nissle). Des expériences de mutagenèse ont prouvé que ClbA peut se substituer à EntD et contribuer à la production d'entérobactine, alors que EntD ne joue aucun rôle dans la synthèse de colibactine (162).

La même étude a démontré que EntD est la PPTase permettant la synthèse de la yersiniabactine chez *E. coli*. Aucun homologue de la PPTase YbtD impliqué dans la production de yersiniabactine chez *Yersinia pestis* n'avait été trouvé parmi les souches de *E. coli*. ClbA peut également remplacer EntD pour la synthèse de yersiniabactine (162).

Ainsi, ClbA peut intervenir dans la synthèse de trois types de sidérophores différents : l'entérobactine, les salmochélines qui sont des dérivés glycosylés de l'entérobactine et la yersiniabactine. Le gène *clbA* participe donc à la production de métabolites issus de deux îlots génomiques différents (*pks* et HPI) et du « core genome » (entérobactine) (**Figure 26**).



**Figure 26** : Carte schématique du chromosome d'une souche de *E. coli* portant l'îlot *pks*

Les « clusters » de gènes permettant la production de l'entérobactine (*ent*), la yersiniabactine (HPI), les salmochélines (*iro*) et la colibactine (*pks*) sont représentés. Les flèches bleues et rouges illustrent la capacité respective des PPTases EntD et ClbA de contribuer à la synthèse d'autres métabolites. D'après Martin P. *et al.* (65,162)

## 2. Production d'un métabolite analgésique

Il a été établi dans la souche *E. coli* Nissle que l'îlot *pks* permet la production d'un lipopeptide analgésique, le C12-asparagine GABA. Les enzymes impliquées sont les premières intervenant dans la chaîne d'assemblage de la colibactine : ClbA, ClbN et ClbB. Ce lipopeptide peut franchir la barrière épithéliale intestinale et agir sur les neurones sensoriels. Il inhibe l'activation neuronale induite par un stimulus nociceptif en limitant le flux de calcium *via* le récepteur GABA<sub>B</sub>. L'îlot *pks* aurait donc un rôle dans le contrôle de la douleur par la bactérie (163).

La PPTase ClbA est donc pléiotrope : elle intervient dans la synthèse de la colibactine, de sidérophores et d'un lipopeptide analgésique. Cela permet d'expliquer en partie pourquoi une souche de *E. coli* Nissle mutée pour *clbA* perd son activité probiotique (164).

### 3. Synthèse de molécules antibiotiques

En étudiant les petites molécules produites par la chaîne PKS-NRPS codée par l'îlot *pks*, Vizcaino *et al.* ont établi que le N-myristoyl-D-asparagine, le produit de clivage de la précolibactine en colibactine active, a un faible effet inhibiteur sur la croissance d'une souche de *Bacillus subtilis*. Pour cette expérience, des concentrations croissantes de la molécule synthétique ont été mises en contact avec une culture de *Bacillus subtilis* pendant 4 heures et la densité optique a été mesurée. Il est à noter que la forme énantiomère synthétique N-myristoyl-L-asparagine n'a pas d'activité antagoniste (134).

Par ailleurs, une souche de *E. coli* portant l'îlot *pks* sur un chromosome bactérien artificiel exerce une activité antagoniste *pks*-dépendante sur des souches de *Staphylococcus aureus* que ce soit en coculture en milieu liquide ou en test de diffusion sur milieu gélosé (méthode similaire à la **Figure 19**, voir paragraphe IV. 1. de la section sur les sidérophores-microcines) (165). Cet effet anti-staphylococcique est observé qu'il s'agisse de souches de *S. aureus* multi-sensibles, résistantes à la méticilline seule ou résistantes aux glycopeptides (en plus de la méticilline). Les autres cocci à Gram positif testés dans cette étude, streptocoques, entérocoques ou staphylocoques à coagulase négative ne sont pas sensibles à cet effet antibiotique de la souche *pks+*. L'effet anti-staphylococcique est perdu en cas de mutation de *clbP* (165) mais aussi de *clbH* ou *clbC* (données non publiées de notre laboratoire). Ces deux derniers gènes ne participent pas à la production du N-myristoyl-D-asparagine (133). L'effet anti-staphylococcique *pks*-dépendant fait donc intervenir un ou plusieurs autres métabolites de l'îlot *pks*.

# **RESULTATS EXPERIMENTAUX**



## **Article 1 : Relation entre îlots sidérophores-microcines et *pks* chez *E. coli* Nissle**

### **Deciphering the interplay between the genotoxic and probiotic activities of *Escherichia coli* Nissle 1917**

Clémence Massip, Priscilla Branchu, Nadège Bossuet-Grief, Camille Chagneau, Déborah Gaillard, Patricia Martin, Michèle Boury, Thomas Sécher, Damien Dubois, Jean-Philippe Nougayrède, Eric Oswald

Soumis à *Plos Pathogens*

La souche *E. coli* Nissle est administrée comme probiotique depuis plus d'un siècle sous l'appellation Mutaflor®. Elle est employée pour des indications variées telles que les diarrhées, la constipation ou les maladies inflammatoires de l'intestin (8). L'effet probiotique de cette souche est en partie lié à son activité antagoniste contre des bactéries phylogénétiquement proches, qu'il s'agisse de bactéries commensales ou pathogènes comme *Salmonella* Typhimurium (93).

Cependant, cette souche probiotique est également porteuse de l'îlot génomique *pks* à l'origine de la synthèse d'une génotoxine, la colibactine. Cette dernière constitue un authentique facteur de virulence de *E. coli* (12,13) et est également dotée de propriétés pro-carcinogènes (14,151). Chez *E. coli* Nissle, l'intrication semble très forte entre propriétés probiotiques et pouvoir pathogène potentiel. En effet, la phosphotransférase ClbA connue comme pour son rôle dans la synthèse de la colibactine est également impliquée dans la synthèse de l'entérobactine (162) et de lipopeptides analgésiques (163).

Nous avons donc tenté de dissocier les activités génotoxiques et probiotiques de *E. coli* Nissle, afin de proposer une souche d'administration plus « sûre ». Nous avons déterminé, par l'étude de mutants de l'îlot *pks*, que seule la peptidase ClbP est indispensable à l'activité antibiotique de *E. coli* Nissle. Cette peptidase n'était connue que pour son rôle dans l'étape terminale de maturation de la précolibactine inactive en colibactine génotoxique (132).

Le site catalytique de ClbP, essentiel à la maturation de la colibactine n'intervient pas dans l'activité antagoniste de *E. coli* Nissle, mais seulement la partie C-terminale de ClbP comprenant les 3 hélices permettant son ancrage dans la membrane interne. Une souche *E. coli* Nissle portant une simple substitution d'acide aminé dans son site catalytique est ainsi dépourvue d'activité génotoxique, mais conserve toutes ses propriétés antibactériennes.

De précédentes études ont montré que les sidérophores-microcines H47 et M sont à l'origine de l'activité antagoniste de *E. coli* Nissle (9). Ce sont des peptides antimicrobiens hybrides, constitués d'une entité peptidique couplée post-traductionnellement à un groupement dérivé d'un sidérophore, l'entérobactine (93). Nous avons montré que l'activité antagoniste ClbP-dépendante de *E. coli* Nissle est liée aux sidérophores-microcines H47 et M.

Par rapport au système génétique conduisant à la synthèse des sidérophores-microcines chez les souches *E. coli* H47, CA46 et CA58, l'îlot sidérophores-microcines de *E. coli* Nissle est tronqué (93). Les gènes *mcmL* et *mcmK* codant respectivement une entérobactine glucosyltransférase et une entérobactine estérase sont absents. Nous avons montré que *IroB*, impliqué dans la synthèse de salmochélines (166) est indispensable à l'activité antagoniste de *E. coli* Nissle, probablement en assurant le rôle de son homologue *McmL* manquant.

Par une étude bio-informatique, nous avons déterminé que l'ensemble des souches de *E. coli* portant un îlot sidérophores-microcines tronqué appartient au phylogroupe B2 et possède l'îlot *pks* et l'îlot salmochéline. Il s'agit essentiellement de souches isolées d'urines (CFT073, ABU83972 et ATCC25922). Nous avons démontré pour toutes ces souches, que l'effet antibiotique est ClbP-dépendant. A l'inverse, les souches possédant un îlot sidérophores-microcines « non tronqué » sont dépourvues de l'îlot *pks* et du locus *iroA*. Toutes sont issues d'isolats fécaux et appartiennent aux phylogroupes B1, C ou D.

Cette étude met donc en évidence une synergie fonctionnelle entre les îlots sidérophores-microcines, *pks* et le locus *iroA* chez les souches de *E. coli* du phylogroupe B2.

# Deciphering the interplay between the genotoxic and probiotic activities of *Escherichia coli* Nissle 1917

Clémence Massip<sup>1,2</sup>, Priscilla Branchu<sup>1</sup>, Nadège Bossuet-Grief<sup>1</sup>, Camille Chagneau<sup>1</sup>, Déborah Gaillard<sup>1</sup>, Patricia Martin<sup>1</sup>, Michèle Boury<sup>1</sup>, Thomas Sécher<sup>1</sup>, Damien Dubois<sup>1,2</sup>, Jean-Philippe Nougayrède<sup>1</sup>, Eric Oswald<sup>1,2</sup>

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

2, CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service de Bactériologie-Hygiène, Toulouse, France

## Short title:

Interplay between siderophore microcins and *pks* islands in *Escherichia coli* Nissle

**Keywords:** Nissle 1917, probiotic, colibactin, microcin, ClbP, *pks* island, *Escherichia coli*, siderophore, salmochelin

## Abstract

Although *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) has been used therapeutically for over a century, the determinants of its probiotic activity remain elusive. In addition to the production of two siderophore-microcins (Mcc) responsible for its direct antibacterial effect, EcN synthesizes the genotoxin colibactin encoded by the *pks* island. Colibactin is a virulence factor and a putative pro-carcinogenic compound. Therefore, we tried to decouple the probiotic activity of EcN from its genotoxic activity. We demonstrated that the *pks*-encoded ClbP, the enzyme that activates the genotoxin colibactin, is required for the siderophore-microcins activity of probiotic EcN, but interestingly, not its enzymatic domain that cleaves precolibactin to form active colibactin. This ClbP-dependent antibacterial effect was only observed in *E. coli* strains that carry both a truncated form of the Mcc gene cluster and the *pks* island. In such

strains, siderophore-Mcc synthesis also required the glucosyltransferase IroB from the salmochelin gene cluster. This interplay between colibactin, salmochelin, and siderophore-Mcc biosynthetic pathways suggests that the three genomic islands were co-selected and played a crucial role in the evolution of *E. coli* from phylogenetic group B2. This co-evolution observed in EcN illustrates the fine margin between pathogenicity and probiotic activities, and the need to address both the effectiveness and the safety of probiotics. Decoupling the probiotic from the genotoxic activities by specifically targeting the peptidase domain of ClbP opens the way to safe use of EcN.

### **Author summary**

*Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) has been used as a probiotic for over a century. However, it produces the genotoxin colibactin, which has been linked to the virulence of certain *E. coli* strains and could promote colorectal cancer. Administering a potentially pro-carcinogenic strain as a probiotic raises public health concerns. Therefore, our aim was to separate EcN genotoxic activity from its probiotic effect. EcN demonstrates direct antibacterial activity through two antimicrobial peptides linked to a siderophore, siderophore-microcins. We demonstrated that the production of these siderophore-microcins by EcN requires ClbP, an essential enzyme for colibactin production, and another enzyme involved in the synthesis of an iron-chelating system. This interplay was found in other *E. coli* strains, mainly isolated from urine. Therefore, *E. coli* strains utilize determinants from three distinct metabolic pathways to synthesize siderophore-microcins. Interestingly, ClbP peptidase activity mandatory for colibactin production, has no role in siderophore-microcin production, which provides a way to construct a non-genotoxic strain that retains its antibacterial activity. In contrast, ClbP transmembrane domain is required for production of siderophore-microcins. Given this intricate interplay between probiotic and pathogenic determinants, in the future, biosynthetic pathways should be studied at the level of protein domains rather than that of whole proteins.

## Introduction

The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) was isolated during World War I by Alfred Nissle in a soldier who resisted a severe diarrhea outbreak (1,2). EcN was initially studied for its ability to fight bacterial gastrointestinal infections. It was demonstrated to impede intestinal colonization by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (3,4) and to exhibit an antibacterial activity against enterohemorrhagic *E. coli* strains (5). EcN is an excellent colonizer of the human gut, and exhibits beneficial effects in various intestinal dysfunctions such as acute diarrhea in infants and toddlers (6), chronic constipation (7), and abdominal pain in patients with irritable bowel syndrome (8). It has been widely used in the treatment of inflammatory bowel diseases (1) and has proven to be as effective as the gold standard mesalazine for the maintenance of remission in ulcerative colitis in children and adults (9).

EcN probiotic activity is believed to be based on multiple peculiar properties and fitness determinants, including antibacterial activities against other bacteria (10). Thanks to an extensive list of siderophores (enterobactin, salmochelin, yersiniabactin, and aerobactin) and multiple siderophore receptors and iron transport systems, EcN reduces *S. Typhimurium* intestinal colonization by competing for iron (3). Enterobactin, salmochelin and yersiniabactin are nonribosomal peptides (NRP) or polyketide (PK)-NRP hybrids, which are synthesized by NRP synthetases and PK synthases (NRPS and PKS) activated by a cognate phosphopantetheinyl transferase (PPTase). In addition to this competition for a limiting nutrient, EcN exhibits a direct antibacterial activity linked to the production of two microcins (Mcc), H47 (MccH47) and M (MccM) (4,11–13). Mcc are secreted low-molecular weight peptides that are synthesized by ribosomes and posttranslationally modified, and which display a potent bactericidal activity against phylogenetically-related bacteria (14,15). MccH47 and MccM are called “siderophore-Mcc” because they are modified posttranslationally by the linkage of a catechol siderophore (13,16). The C-terminus of the Mcc peptide is covalently bound with a linearized and glycosylated derivative of enterobactin (13,16,17). This siderophore moiety is recognized by the catecholate-siderophore receptors of the target bacterium (12,16). The siderophore-Mcc can therefore enter and kill the sensitive bacterium by a “Trojan Horse” stratagem, by mimicking the iron-siderophore complexes.

Comparative genomic analyses have shown that EcN is closely related to pathogenic *E. coli* strains such as the uropathogenic strain CFT073 (18–20). EcN and CFT073 share eight genomic islands, including the *pks/clb* island encoding a NRPS-PKS assembly line that synthesizes the genotoxin colibactin (21,22). Colibactin is produced as a prodrug moiety that is exported in the periplasm by the efflux pump ClbM (23) and then hydrolyzed by the periplasmic membrane-bound ClbP protein with a peptidase activity, which releases the active colibactin (24,25). Colibactin is not only a *bona fide* virulence factor (26,27) but also a putative procarcinogenic compound. Colibactin alkylates the host cell DNA, resulting in DNA crosslinks, double-strand breaks, chromosome aberrations and gene mutations both *in vitro* and *in vivo* (21,22,28–30). Colibactin-producing *E. coli* are overrepresented in biopsies of patients with colorectal cancer (31,32) and they were shown to promote colorectal cancer in mouse models (31,33).

The ambivalence between the pathogenic and probiotic potential of EcN was uncovered when we showed that certain enzymes of the *pks/clb* island enable the synthesis of analgesic lipopeptides (34) and that the probiotic properties of EcN are related to the presence of the pathogenicity island (35). In the Olier *et al.* (2012) study, we inactivated the gene that encodes the phosphopantetheinyl transferase (PPTase) ClbA, which was thought to be specific for colibactin synthesis. However, more recent work has shown that ClbA has a pleiotropic effect and also modulates the synthesis of siderophores as well as that of the analgesic lipopeptides (34,36). As might be expected, use of a probiotic strain that produces a genotoxin is a public health concern. We therefore attempted to clearly decouple the genotoxic from the probiotic activities. In this study, we used our knowledge of the biosynthetic pathway of colibactin and other secondary metabolites produced directly or indirectly by the *pks/clb* island to specifically abrogate the genotoxic activity of colibactin. We examined the ability of mutants to inhibit the growth of pathogenic bacteria while still producing beneficiary secondary metabolites. We successfully decoupled the probiotic activity from the genotoxic activity, consequently opening the way to optimize EcN. However, we were surprised to observe that the *pks/clb* island was even more intimately connected to EcN probiotic activity than we expected, and that there was a co-evolution of pathogenic and probiotic properties in bacteria. EcN is, to some extent, like the “miracle drug” aspirin. Although, like aspirin, this bacterial strain has been used successfully for

over a century, it is crucial to understand the method of action and to take into account the safety and potential side effects.

## Results

### ***EcN antibacterial activity requires ClbP but not the other components of the colibactin synthesis pathway***

In order to specifically decouple the genotoxic activity from the probiotic activity, we tested the antibacterial activity of the EcN mutant deleted for ClbP that allows the maturation of precolibactin in genotoxic colibactin (24,25). We compared it to the pleiotropic ClbA mutant coding for a PPTase (27,35,36). We performed co-culture experiments with the wild-type EcN, the EcN  $\Delta clbA$  and  $\Delta clbP$  mutants, and the Crohn's disease-associated *E. coli* strain LF82 which have been previously shown to be susceptible to EcN (45,46). CFU showed that the EcN strain strongly inhibited LF82 growth. EcN antibacterial activity on LF82 was not altered in a  $\Delta clbA$  mutant but was completely lost in a  $\Delta clbP$  mutant (Fig 1). A kinetic experiment indicated that EcN inhibitory activity on LF82 started 6 hours post-inoculation and reached its maximum 8 hours post-inoculation, at the beginning of the stationary phase (Fig S1). LF82 growth was not altered at any time by the  $\Delta clbP$  mutant, further proving the ClbP-dependence of the EcN antibacterial effect. This EcN ClbP-dependent inhibitory activity was also observed with other pathogenic strains of *E. coli* and closely related bacteria species, such as *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium, and *Enterobacter aerogenes* (Fig S2).

To further determine whether other components of the colibactin synthesis pathway besides ClbP are required for EcN antibacterial activity, the inhibitory effect of mutants for the PKS ClbC and ClbO, the NRPS ClbH and ClbN, the hybrid PKS-NRPS ClbB, the putative amidase ClbL, the efflux pump ClbM, and the thioesterase ClbQ were assessed against LF82. EcN antibacterial activity against LF82 was not altered in any of these mutants (Fig 1). These results confirm that colibactin itself or the cleavage product N-myristoyl-D-asparagine is not essential for EcN antibacterial activity against LF82 (and other Gram-negative bacteria, data not shown). Therefore, the probiotic activities of EcN are clearly associated with the presence of the *pks/clb* island and ClbP but not colibactin is involved in EcN inhibitory activity.

### ***EcN ClbP-dependent antibacterial activity requires MccH47 and MccM***

Previous studies have associated EcN antibacterial activity with MccH47 and MccM (4,11,14,15). Therefore, we performed co-culture experiments with LF82, EcN and mutants in MccH47 and MccM production systems. EcN antibacterial activity against LF82 was not affected by the deletion of the MccM precursor gene *mcmA* alone or the MccH47 precursor gene *mchB* alone (Fig 2). In contrast, deletions of both *mcmA* and *mchB* almost completely abrogated the inhibitory effect of EcN on LF82. Similarly, deletion of the MccM and MccH47 efflux pump encoding genes *mchE* and *mchF* resulted in a loss of antibacterial activity (Fig 2). The trans-complementation of *mchE* and *mchF* increased EcN inhibitory activity compared to the wild-type EcN strain (Fig 2), probably because of an increase in Mcc export following overexpression of the MchE-MchF efflux pump. None of these mutations in the Mcc production system affected the ability of EcN to produce active colibactin (Fig S3).

To further confirm the role of MccH47 and MccM in EcN antibacterial activity, plasmids that encode MccH47 or MccM immunity genes were transformed in LF82, and the resulting resistance of the strains was assessed against EcN (Fig S4). EcN  $\Delta mchB$  mutant antibacterial activity was almost completely abrogated on LF82 that carries the MccM immunity gene *mcmI* (Fig S4A). A similar result was obtained with the  $\Delta mcmA$  mutant and LF82 that carries MccH47 immunity gene *mchI* (Fig S4B). Overall, these results confirmed that the EcN ClbP-dependent inhibitory activity against LF82 is due to MccH47 and MccM.

### ***EcN ClbP-dependent antibacterial activity is due to the production of siderophore-Mcc***

MccH47 and MccM can be modified posttranslationally by the linkage of a catechol siderophore to form a “siderophore-Mcc” (13). Therefore, we hypothesized that the ClbP-dependent antibacterial activity might be dependent on these modified forms of microcins. In fact, EcN antibacterial activity against LF82 was strongly reduced in a  $\Delta entE$  mutant deprived of the enzyme 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase essential for siderophore enterobactin production (47). Similar results were obtained with the EcN  $\Delta clbA \Delta entD$  double mutant which was unable to produce enterobactin (36) (Fig 3).

The two genes responsible for enterobactin glycosylation and esterification (*mcmL* and *mcmK*) are missing from the EcN Mcc gene cluster (18,48). As a result,

whether MccH47 and MccM are siderophore-Mcc or unmodified Mcc is still being debated (13). Considering that EcN carries the MccL and MccK homologs, glucosyltransferase IroB and esterase IroD respectively (13), we investigated the interplay between the Mcc and the salmochelin production systems. The antibacterial activity of EcN mutants for genes that encode the glucosyltransferase IroB, the cytoplasmic esterase IroD, the periplasmic esterase IroE, and the export protein IroC (49,50) was compared to the activity of the wild-type EcN strain. Only *iroB* deletion led to a significant decrease in EcN antibacterial activity (Fig 3). Complementation of the  $\Delta$ *iroB* mutant fully restored the antibacterial activity. None of these mutations in the *iroA* locus affected EcN ability to cause megalocytosis linked with the colibactin genotoxic effect (Fig S3). These results suggest that IroB could be responsible for enterobactin glycosylation, which enables the linkage of Mcc precursor proteins to the siderophore-derived moiety in the absence of MccL.

MchC and MchD are respective homologous to MceJ and MceI of *K. pneumoniae* strain E492 (13). These proteins form a complex responsible for the linkage of glycosylated enterobactin derivatives to MccE492 the precursor peptide MceA (51). The EcN mutant for *mchC* and *mchD* lost the antibacterial effect against LF82, whereas complementation restored the initial phenotype (Fig 2). These results indicate that the posttranslational modification of MccH47 and MccM with an enterobactin-derived moiety is required for EcN antibacterial activity. In short, EcN ClbP-dependent antibacterial activity is due to siderophore-Mcc.

***The ClbP transmembrane domain, rather than the periplasmic peptidase catalytic site, is required for the antibacterial activity of EcN***

To further elucidate the role of ClbP in siderophore-Mcc production, we examined whether ClbP catalytic activity is required for EcN antibacterial activity. S95 and K98 are key residues for ClbP peptidase activity, and mutants for these residues fail to cleave precolibactin to release mature active genotoxin (24,25). Co-culture experiments were performed with LF82 and the EcN  $\Delta$ *clbP* mutant complemented with plasmids that encode the wild-type ClbP protein, or the ClbP protein that harbors the substitutions S95A or K98T. EcN  $\Delta$ *clbP* mutants complemented with ClbP S95A or K98T demonstrated antibacterial activities similar to those of the wild-type ClbP protein (Fig 4), whereas they lost their ability to cause megalocytosis linked with the colibactin genotoxic effect (Fig S3).

To exclude the role of another putative catalytic site of ClbP enzymatic domain, this enzymatic domain was replaced by alkaline phosphatase enzymatic domain of PhoA, as previously reported (38). The PhoA domain was fused with the ClbP N-terminal signal sequence which allows the translocation to periplasm, and the ClbP C-terminal sequence from amino-acid 390; the residues forming the three transmembrane helices being 390-412, 433-455, and 465-485 (24). An EcN  $\Delta clbP$  mutant transformed with a plasmid bearing this fusion demonstrated a similar inhibitory activity against LF82 as the EcN WT strain (Fig 4), whereas it did not cause megalocytosis (Fig S3). Therefore, the C-terminal domain of ClbP that comprises the three transmembrane helices is essential for EcN antibacterial activity, as opposed to the ClbP periplasmic peptidase domain which is crucial only for genotoxic activity.

To confirm this observation, and as a proof of the concept that a non-genotoxic EcN probiotic strain could be engineered, we used genome editing to construct an EcN mutant strain that exhibits a single nucleotide mutation in the chromosomal *clbP* gene, which leads to an S95A mutation in the ClbP catalytic site at the amino-acid level. This mutant did not produce colibactin and is not genotoxic but still exhibited an antibacterial activity towards LF82 that is similar to that of the wild-type genotoxic EcN strain (Fig 5).

Cumulatively, these results show that it is possible to decouple the genotoxic activity of EcN from its probiotic activity, but also that the biosynthetic pathways of colibactin and siderophore-microcins are more entangled than we initially thought.

### ***The ClbP-dependent antibacterial activity is observed in a subset of E. coli strains that carry a truncated Mcc gene cluster and the pks island***

Comparative genomic analyses have shown that EcN is closely related to *E. coli* pyelonephritis strain CFT073 and the asymptomatic bacteriuria strain ABU83972 (18). These three strains, as well as the reference strain ATCC<sup>®</sup>25922, carry the *pks* island, the *iroA* locus, and a truncated Mcc gene cluster deprived of genes *mcmL/mchA* and *mcmK/mchS1*. Therefore, we assessed whether the siderophore-Mcc antibacterial effect of these strains was ClbP-dependent, as observed in EcN. The inhibitory effect of two sets of *E. coli* strains was tested in co-culture experiments against LF82, as well as their respective  $\Delta clbP$  mutants: i) strains similar to EcN that carry both a truncated Mcc gene cluster and the *pks* island: strains CFT073, ABU83972, and ATCC<sup>®</sup>25922; and ii) strains that carry the *pks* island but which are deprived of Mcc encoding genes: the human commensal strain M1/5, the meningitis-causing strain SP15, the murine

commensal strain NC101, and the laboratory strain MG1655 that hosts a bacterial artificial chromosome (BAC) bearing the *pks* island. The three wild-type strains that carry both a truncated Mcc gene cluster and the *pks* island exhibited a marked inhibitory effect as observed in EcN (Fig S5). The inhibitory effect of all three corresponding  $\Delta clbP$  mutant strains was significantly reduced, whereas ClbP complementation restored the initial phenotype (Fig S5). In contrast, in strains carrying only the *pks* island, there was no significant difference in LF82 growth whether it was cultivated with the wild-type strains or the  $\Delta clbP$  mutants (Fig S5). Cumulatively, these results show that the peptidase ClbP is involved in MccH47 and MccM antibacterial activity in *E. coli* strains that carry both the *pks* island and a truncated form of the Mcc gene cluster. Our results also show that this association is present in both pathogenic strains and probiotic strains.

### ***Distribution of pks, salmochelin and the MccH47 and MccM gene clusters in an E. coli population***

We demonstrated that strains of *E. coli* that carry a truncated Mcc gene cluster exhibit a siderophore-Mcc-dependent antibacterial activity (Fig 6A). This antibacterial activity requires ClbP from the biosynthetic pathway that produces the genotoxin colibactin and IroB from the biosynthetic pathway that produces the siderophore salmochelin. Consequently, we checked this association between the *pks* island, the *iro* locus and the Mcc island in *E. coli* strains with genomes available in GenBank. Interestingly, all strains that lacked the *mcmL* and *mcmK* genes responsible for posttranslational modifications belonged to the B2 phylogroup and carried the *pks* island and *iroA* (Fig 6B), except for strain 1105 deprived of *pks* island. Conversely, the strains that carry *mcmL/mchA* and *mcmK/mchS1* belonged to B1, C or D phylogroups and lacked the *pks* island. These particular associations of genetic determinants led to the hypothesis that the truncated island is present almost exclusively in strains that carry *pks* and the *iroA* locus. It suggests that this interplay between colibactin, salmochelin, and the siderophore-Mcc biosynthetic pathways is due to a co-selection in strains that is either pathogenic or probiotic.

## Discussion

Since Fleming discovered penicillin in 1928, antibiotics have contributed to the increase in human life expectancy. Many infections which were previously fatal became curable. Unfortunately, the overuse and misuse of antibiotics, in parallel with the lack of new antibacterial drugs enabled multi-resistant bacteria to emerge and spread (52). According to the World Health Organization (WHO), this phenomenon “poses a substantial threat to morbidity and mortality worldwide” (53). The trend is especially worrying for Gram-negative bacteria. For instance, the number of deaths attributable to 3<sup>rd</sup> generation cephalosporin-resistant or carbapenem-resistant *E. coli* increased by more than 4 times in Europe between 2007 and 2015 (54). Of the antibiotics that are currently being developed for intravenous administration, only a small proportion (15 out of 44) demonstrates some activity against Gram-negative bacteria, and all these molecules are derived from known antibiotic classes. Consequently, the WHO established that research and development of new antibiotics against Gram-negative bacteria was a “critical priority” (53).

In the search for new antimicrobials, microcins seem a promising alternative to “conventional” antibiotics. In fact, many microcins exhibit potent narrow-spectrum antimicrobial activity, whereas antibiotics can eliminate beneficial bacteria, alter the microbiota and promote the selection of resistant strains (55,56). A major challenge in using microcins is their delivery in sufficient quantities to the site of infection, especially after oral administration because they are often degraded in the upper digestive tract (57,58). Engineered probiotic bacteria were consequently proposed as *in situ* producers of microcins to fight against enteropathogens (59) or to reduce colonization by multi-resistant bacteria (60).

EcN has been used as a probiotic for over a century, with numerous therapeutic benefits described. However, serious concerns about the safety of EcN administration have emerged over the years. EcN was reported to be responsible for severe sepsis in an infant (61) and its genome was shown to have the pathogenicity island *pks* (21,35), which codes for colibactin, a *bona fide* virulence factor for *E. coli* strains responsible for extraintestinal infections (26,27). In addition, the carriage of colibactin producing *E. coli* could also be deleterious to gut homeostasis. In adult rats, it increased intestinal epithelial permeability and led to signs of genotoxic damages in intestinal cells, such as crypt fission and increased cell proliferation (28). In mice predisposed to colorectal cancer, *pks*-positive *E. coli* increased the size and the

number of tumors (31,62). In human beings, several studies reported that *pks*-positive *E. coli* were over-represented in colorectal cancer biopsies compared to controls (31,32,63). On a whole, these studies suggest that colibactin-producing bacteria could promote tumorigenesis. Therefore, our goal was to understand the interplay between the production of the genotoxin colibactin and the beneficial effects related to the *pks* island in the probiotic activity of EcN. Consequently, we attempted to disarm EcN while keeping its probiotic properties.

In a previous attempt, our team constructed a non-genotoxic EcN PPTase ClbA mutant, which also lost its probiotic activity (35). Subsequently, it was discovered that the PPTase ClbA contributes to the synthesis of enterobactin (and therefore salmochelin) and yersiniabactin (36). In this study, we demonstrated that there is collaboration between the salmochelin (*iroB*) and the Mcc gene clusters, both of which are located on EcN genomic island I, and the *pks* island (*clbP*) (Fig 7). The interweaving is so strong between these determinants, that a single protein, ClbP is involved both in colibactin and Mcc production. Up until now, ClbP had only been described as a peptidase that removes the *N*-acyl-*D*-asparagine prodrug scaffold from precolibactin (24,25). Although the complete C-terminal domain with the three transmembrane helices is required for the bioactivity of ClbP, the catalytic activity is performed by the N-terminal periplasmic domain (25,38). In this study, we demonstrated that the C-terminal domain of ClbP, deprived of the known enzymatic function, is necessary for EcN antibacterial activity due to MccH47 and MccM. It suggests that the ClbP C-terminal transmembrane domain could facilitate the export of the MccH47 and MccM of EcN through the MchE-MchF efflux pump (Fig 8).

Using both functional and bioinformatic analyses, we demonstrated interplay between siderophore-Mcc, salmochelin, and colibactin assembly lines. Strikingly, two groups of *E. coli* strains emerged. On one hand, all strains that carry a “truncated” MccH47 and MccM gene cluster (*i.e.* strains such as EcN lacking *mcmL/mchA* and *mcmK/mchS1*) are B2 strains that also bear the *pks* island and the *iroA* locus. It should be noted that isolates from urine were over-represented in this group of strains (CFT073, clones D i14 and D i2, UPEC 26-1, and ABU 83972). On the other hand, the *pks* island and the *iroA* locus are absent in the non-B2 strains that carry a “complete” MccH47 and MccM gene cluster. All these strains were isolated from stools (except ACN002 for which the origin is unknown). Therefore, we can hypothesize that these strains with a “complete” Mcc gene cluster are specialized in Mcc production in order

to survive in the competitive intestinal environment, which is their exclusive niche. In contrast, extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) must be efficient gut colonizers in order to emerge from the intestinal niche and infect other body sites (such as the urinary tract) to which they must subsequently adapt. That is why it has been suggested that ExPEC are “generalists” rather than specialized strains (64). The strains we examined in our study fit this model. They can express various virulence factors depending on their environment: MccH47 and M, siderophores and analgesic lipopeptides derived from the colibactin pathway, for instance. To be able to produce so many virulence or fitness factors with a genome of limited size (65), the elements of the assembly lines that produce these determinants must be versatile and intervene in several apparently independent metabolic pathways.

In conclusion, we discovered that the *pks* island is even more intimately connected to EcN probiotic activity than expected. This entanglement reflects the co-evolution of probiotic and pathogenic determinants to adapt to various environments. Decoupling the probiotic from the genotoxic activities by specifically targeting the enzymatic domain of ClbP opens the way to safe use of EcN.

## **Materials and methods**

### ***Bacterial strains, mutants and plasmids***

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table S1. Gene mutagenesis was performed by the lambda Red recombinase method (37) with the primers listed in Table S2. The double mutants were constructed sequentially. The mutations and deletion of FRT cassettes were verified by PCR using primers upstream and downstream of the target genes.

The fusion between ClbP N-terminal signal sequence, the alkaline phosphatase PhoA, and the three transmembrane helices of ClbP were constructed using the HiFi DNA assembly kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) with primers overlapping between each fragment (Table S2). The constructions were verified by PCR and confirmed by sequencing. The blue-stained colony-forming units on LB plates with 40 mg/L of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate revealed the presence of the PhoA alkaline phosphatase domain in the periplasm as previously reported (38).

To construct plasmids *pmchEF* and *pmchCD*, the genes were PCR-amplified using primers listed in Table S2 and cloned into pCR-XL-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

To construct plasmid *plroB*, the *iroB* gene was PCR-amplified with EcN genomic DNA as a template and primers IRSDNG7 and IRSDNG8, digested by EcoRI and BamHI and ligated into pBbA5a-RFP (obtained from Addgene) digested to remove the *rfp* gene.

The strain EcN *clbP*-S95A chromosomal isogenic mutant was constructed using a genome editing technique (39). EcN was transformed with pORTMAGE, then grown in LB at 30°C and 300 rpm to reach OD<sub>600</sub>=0.5. An initial mutagenesis cycle was started by inducing the expression of Lambda recombinases and the dominant negative *mutLE32K* allele at 42°C for 15 minutes at 250 rpm. The culture was then cooled to 0°C, washed in water and electroporated with 50 µM of oligonucleotide IRSDNG26 that includes the S95A mutation in the *clbP* gene sequence. In a control experiment, the *lacZ* gene was targeted by a specific mutagenic oligonucleotide. Following recovery in LB at 30°C and 300 rpm for 1 hour, two other mutagenesis cycles were performed, and the bacteria were finally plated on MacConkey agar without any antibiotic. Approximately 33% of the isolates were LacZ negative in the control experiment. Sixty candidate *clbP*-S95A mutants were tested for loss of genotoxicity and megalocytosis phenotype in infected HeLa cells as previously described (40). Non genotoxic mutants that had lost the pORTMAGE plasmid were selected, and were finally verified for removal of a ClaI restriction site by S95A mutation in the PCR amplified *clbP* sequence.

### ***Determination of the genotoxic effect induced by colibactin***

The cellular senescence induced by colibactin was with the associated cell enlargement called megalocytosis and was determined for every EcN mutant constructed in this study in the *Mcc* gene cluster, in the *iroA* locus, and for the *clbP*-S95A mutant. As previously described (40), HeLa cells (ATCC, CCL-2) were infected for 4 hours. The cells were then washed and incubated with gentamicin for 72 hours before staining with Giemsa. The genotoxicity of EcN and the *clbP*-S95A chromosomal mutant was confirmed by an In-Cell Western procedure, as previously described (36). In brief, HeLa cells were infected in 96-well plates for 4 hours at a given multiplicity of infection (number of bacteria per cell at the onset of infection). Four hours

after the end of infection cells were fixed, permeabilized and stained with rabbit monoclonal anti-gamma-H2AX (Cell Signaling, 20E4, 1:200) followed by an infrared fluorescent secondary antibody. DNA was counterstained with RedDot2 (Biotum). Fluorescence was recorded with an Odyssey infrared imaging system (Li-Cor).

### **Competitive growth assay**

Strains were grown in lysogeny broth (LB Lennox, Invitrogen) overnight at 37°C with shaking at 240 rpm. Rifampicin, streptomycin, kanamycin, carbenicillin or chloramphenicol was added as required to the medium.

The media used for co-culture experiments were either M63 minimal medium with final concentrations of 15 mM ammonium sulfate, 1 mM magnesium sulfate heptahydrate, 100 mM monopotassic phosphate, 2.5 g/L glucose, 1 mg/L thiamine, and 1 g/L Bacto tryptone (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), or Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) GlutaMAX (Invitrogen) supplemented with 25 mM HEPES, 10% (v/v) Fetal Calf Serum (FCS, Eurobio, Courtaboeuf, France), and 1% (v/v) Non Essential Amino Acids (NEAA, Invitrogen).

500 µL of each overnight culture were cultured in 9.5 mL of co-culture medium and incubated for 2h at 37°C with shaking at 240 rpm. Both the producing and the target strains (EcN and LF82 respectively) were inoculated from these 2-hour-cultures at 10<sup>6</sup> CFU/mL in 10 mL of co-culture medium as previously described (3) and incubated for 24h at 37°C with shaking at 240 rpm. For CFU numeration, the culture broth was serial-diluted in PBS and plated on selective LB agar plates containing the antibiotic required (e.g. rifampicin for LF82 (41)). In the total results section, only the growth of the target strains (mainly LF82) is reported. As a control, the growth of the competitive strains (mainly EcN and EcN mutants) was systematically checked (data not shown).

### **Bioinformatic analysis**

Genes involved in MccH47 and MccM synthesis were searched using BLASTn and the CA58 Mcc gene cluster as a reference: *mchB* and *mcmA* which encode precursor proteins, the immunity genes *mchl* and *mcml*, genes *mchE* and *mchF* which encode a specific efflux pump, and genes *mcmK* and *mcmL* (and their respective homologs in the *E. coli* H47 Mcc gene cluster, *mchS1* and *mchA*) responsible for posttranslational modifications. A query cover > 80%, an identity > 90%, and an

E-value < 1e-40 were chosen as cutoff values for significance. The genes *clbB* and *clbP*, as respective markers for the 5' and 3' regions of the *pks* island, were identified using the same method, and so were genes *iroN* and *iroB* as markers for the 5' and 3' regions of the salmochelin gene cluster (*iroA* locus). Phylogroups were determined *in silico* based on the presence/absence of 4 genes: *arpA*, *chuA*, *yjaA*, and *tspE4.C2* (and *trpA* to distinguish the A and C phylogroups) (42). The phylogenetic tree was constructed with the *rpoC* sequence. The sequences were collected using PATRIC 3.5.8 (43), aligned by multiple sequence comparison by log-expectation (MUSCLE) with the MEGA7.0.26 software (44), and the phylogenetic tree was constructed according to the maximum likelihood method with MEGA7.0.26.

### **Statistical analyses**

Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 7.0a (GraphPad, San Diego, CA, USA). *P* values were calculated using one-way ANOVA followed by Bonferroni post-tests. CFU/ml were log-transformed for the analyses. *P* values < 0.05 were considered significant and are denoted by ★, *P*<0.01 is denoted by ★★, and *P*<0.001 by ★★★.

### **Acknowledgment**

We thank Séverine Zirah, Museum National d'Histoire Naturelle in Paris, who provided the pMcMi and pMcHi plasmids.

## References

1. Wassenaar TM. Insights from 100 years of research with probiotic *E. coli*. *Eur J Microbiol Immunol*. 2016 Sep 29;6(3):147–61.
2. Sonnenborn U. *Escherichia coli* strain Nissle 1917—from bench to bedside and back: history of a special *Escherichia coli* strain with probiotic properties. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2016 Oct 1
3. Deriu E, Liu JZ, Pezeshki M, Edwards RA, Ochoa RJ, Contreras H, et al. Probiotic bacteria reduce *Salmonella* Typhimurium intestinal colonization by competing for iron. *Cell Host Microbe*. 2013 Jul 17;14(1):26.
4. 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 Dec 8;540(7632):280–3.
5. Rund SA, Rohde H, Sonnenborn U, Oelschlaeger TA. Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on EHEC strains of serotype O104:H4 and O157:H7. *Int J Med Microbiol IJMM*. 2013 Jan;303(1):1–8.
6. Henker J, Laass M, Blokhin BM, Bolbot YK, Maydannik VG, Elze M, et al. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. *Eur J Pediatr*. 2007 Apr;166(4):311–8.
7. Möllenbrink M, Bruckschen E. [Treatment of chronic constipation with physiologic *Escherichia coli* bacteria. Results of a clinical study of the effectiveness and tolerance of microbiological therapy with the *Escherichia coli* Nissle 1917 strain (Mutaflor)]. *Med Klin Munich Ger* 1983. 1994 Nov 15;89(11):587–93.
8. Kruis W, Chrubasik S, Boehm S, Stange C, Schulze J. A double-blind placebo-controlled trial to study therapeutic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in subgroups of patients with irritable bowel syndrome. *Int J Colorectal Dis*. 2012 Apr;27(4):467–74.
9. Losurdo G, Iannone A, Contaldo A, Ierardi E, Di Leo A, Principi M. *Escherichia coli* Nissle 1917 in ulcerative colitis treatment: systematic review and meta-analysis. *J Gastrointest Liver Dis JGLD*. 2015 Dec;24(4):499–505.
10. Sonnenborn U, Schulze J. The non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 – features of a versatile probiotic. *Microb Ecol Health Dis*. 2009 Sep;21(3/4):122-58.
11. Papavassiliou J. Biological characteristics of colicine X. *Nature*. 1961 Apr 1;190:110.
12. Patzer SI. The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catechol siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and Iron. *Microbiology*. 2003 Sep 1;149(9):2557–70.

13. Vassiliadis G, Destoumieux-Garzón D, Lombard C, Rebuffat S, Peduzzi J. Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M and H47. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jan;54(1):288–97.
14. Asensio C, Pérez-Díaz JC, Martínez MC, Baquero F. A new family of low molecular weight antibiotics from enterobacteria. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976 Mar 8;69(1):7–14.
15. Duquesne S, Destoumieux-Garzón D, Peduzzi J, Rebuffat S. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat Prod Rep*. 2007 Jul 25;24(4):708–34.
16. Thomas X, Destoumieux-Garzón D, Peduzzi J, Afonso C, Blond A, Birlirakis N, et al. Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J Biol Chem*. 2004 Jul 2;279(27):28233–42.
17. Nolan EM, Fischbach MA, Koglin A, Walsh CT. Biosynthetic tailoring of microcin E492m: post-translational modification affords an antibacterial siderophore-peptide conjugate. *J Am Chem Soc*. 2007 Nov 21;129(46):14336–47.
18. Grozdanov L, Raasch C, Schulze J, Sonnenborn U, Gottschalk G, Hacker J, et al. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol*. 2004 Aug;186(16):5432–41.
19. Vejborg RM, Friis C, Hancock V, Schembri MA, Klemm P. A virulent parent with probiotic progeny: comparative genomics of *Escherichia coli* strains CFT073, Nissle 1917 and ABU 83972. *Mol Genet Genomics*. 2010 Mar 31;283(5):469–84.
20. Reister M, Hoffmeier K, Krezdorn N, Rotter B, Liang C, Rund S, et al. Complete genome sequence of the gram-negative probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Biotechnol*. 2014 Oct 10;187:106–7.
21. 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 Aug 11;313(5788):848–51.
22. 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 U S A*. 2010 Jun 22;107(25):11537–42.
23. 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 Jan 11;1(1):nmicrobiol20159.
24. 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 Oct 14;286(41):35562–70.
25. Brotherton CA, Balskus EP. A prodrug resistance mechanism is involved in colibactin biosynthesis and cytotoxicity. *J Am Chem Soc*. 2013 Mar 6;135(9):3359–62.

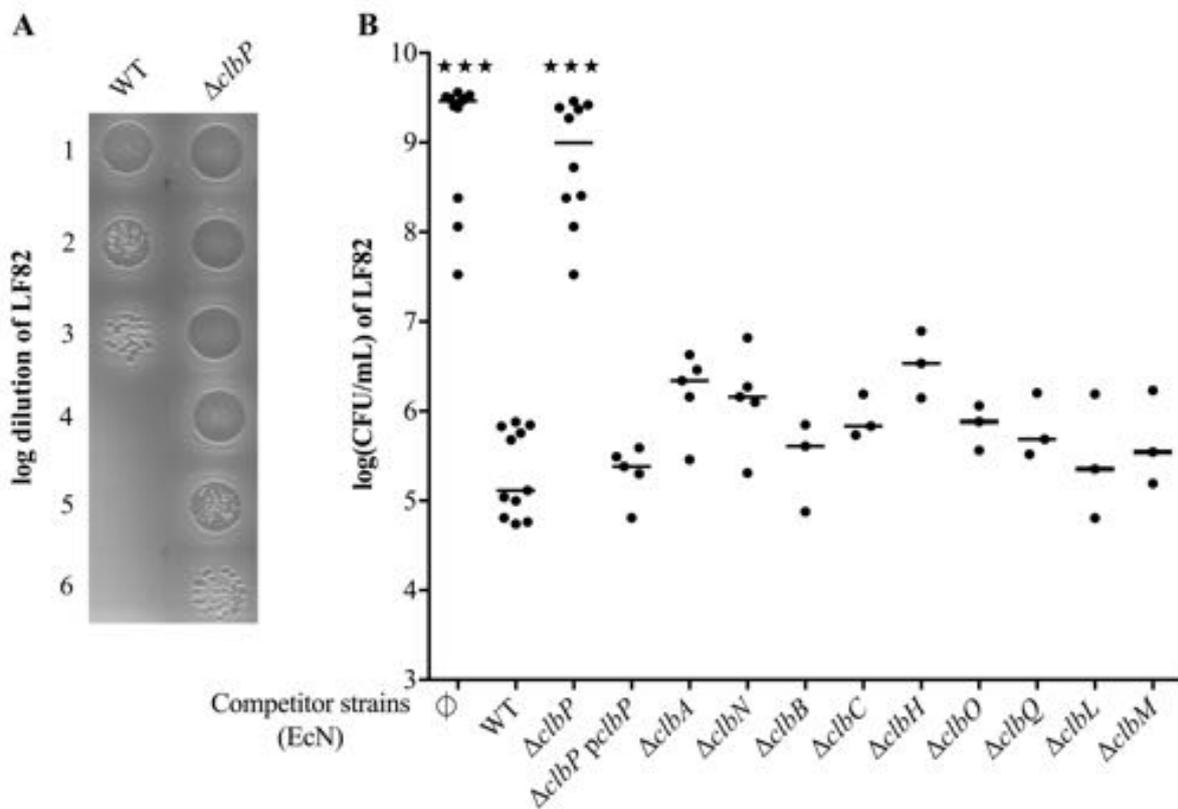
26. Marcq I, Martin P, Payros D, Cuevas-Ramos G, Boury M, Watrin C, et al. The genotoxin colibactin exacerbates lymphopenia and decreases survival rate in mice infected with septicemic *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 2014 Jul 15;210(2):285–94.
27. McCarthy AJ, Martin P, Cloup E, Stabler RA, Oswald E, Taylor PW. The genotoxin colibactin is a determinant of virulence in *Escherichia coli* K1 experimental neonatal systemic infection. *Infect Immun*. 2015 Sep 1;83(9):3704–11.
28. 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 May 1;5(3):313–25.
29. Bossuet-Greif N, Vignard J, Taieb F, Mirey G, Dubois D, Petit C, et al. The colibactin genotoxin generates DNA interstrand cross-links in infected cells. *mBio* [Internet]. 2018 Mar 20; 9(2).
30. Xue M, Shine E, Wang W, Crawford JM, Herzon SB. Characterization of natural colibactin–nucleobase adducts by tandem mass spectrometry and isotopic labeling. Support for DNA alkylation by cyclopropane ring opening. *Biochemistry*. 2018 Nov 13;57(45):6391–4.
31. 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 Oct 5;338(6103):120–3.
32. 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* [Internet]. 2013 Feb 14 8(2).
33. 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 Dec;63(12):1932–42.
34. Pérez-Berezo T, Pujo J, Martin P, Faouder P, Galano J-M, Guy A, et al. Identification of an analgesic lipopeptide produced by the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Nat Commun*. 2017 Nov 3;8(1):1314.
35. 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 Nov 1;3(6):501–9.
36. 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* [Internet]. 2013 Jul;9(7).
37. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 6;97(12):6640–5.

38. Cougnoux A, Gibold L, Robin F, Dubois D, Pradel N, Darfeuille-Michaud A, et al. Analysis of structure–function relationships in the colibactin-maturing enzyme ClbP. *J Mol Biol.* 2012 décembre;424(3–4):203–14.
39. Gallagher RR, Li Z, Lewis AO, Isaacs FJ. Rapid editing and evolution of bacterial genomes using libraries of synthetic DNA. *Nat Protoc.* 2014 Oct;9(10):2301–16.
40. Bossuet-Greif N, Belloy M, Boury M, Oswald E, Nougayrede J-P. Protocol for HeLa cells infection with *Escherichia coli* strains producing colibactin and quantification of the induced DNA-damage. *BIO-Protoc [Internet].* 2017;7(16).
41. Boudeau J, Glasser A-L, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn’s disease. *Infect Immun.* 1999 Sep;67(9):4499–509.
42. 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 Feb 1;5(1):58–65.
43. Wattam AR, Davis JJ, Assaf R, Boisvert S, Brettin T, Bun C, et al. Improvements to PATRIC, the all-bacterial bioinformatics database and analysis resource center. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jan 4;45(D1):D535–42.
44. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016 Jul 1;33(7):1870–4.
45. Boudeau J, Glasser A-L, Julien S, Colombel J-F, Darfeuille-Michaud A. Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent–invasive *Escherichia coli* strains isolated from patients with Crohn’s disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003 juillet;18(1):45–56.
46. Huebner C, Ding Y, Petermann I, Knapp C, Ferguson LR. The probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 reduces pathogen invasion and modulates cytokine expression in Caco-2 cells infected with Crohn’s disease-associated *E. coli* LF82. *Appl Environ Microbiol.* 2011 Apr 1;77(7):2541–4.
47. Rusnak F, Faraci WS, Walsh CT. Subcloning, expression, and purification of the enterobactin biosynthetic enzyme 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase: demonstration of enzyme-bound (2,3-dihydroxybenzoyl)adenylate product. *Biochemistry.* 1989 Aug 22;28(17):6827–35.
48. Poey ME, Azpiroz MF, Laviña M. Comparative analysis of chromosome-encoded microcins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Apr;50(4):1411–8.
49. Lin H, Fischbach MA, Liu DR, Walsh CT. *In vitro* characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. *J Am Chem Soc.* 2005 Aug 10;127(31):11075.
50. Zhu M, Valdebenito M, Winkelmann G, Hantke K. Functions of the siderophore esterases IroD and IroE in iron-salmochelin utilization. *Microbiology.* 2005;151(7):2363–72.

51. Nolan EM, Walsh CT. Investigations of the MceJ-catalyzed posttranslational modification of the microcin E492 C-terminus: linkage of ribosomal and nonribosomal peptides to form “Trojan Horse” antibiotics. *Biochemistry*. 2008 Sep 2;47(35):9289–99.
52. Ventola CL. The Antibiotic Resistance Crisis. *Pharm Ther*. 2015 Apr;40(4):277-83.
53. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018 Mar 1;18(3):318-27.
54. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2018 Nov 5;0(0).
55. Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol*. 2013 Feb;11(2):95–105.
56. Raffatellu M. Learning from bacterial competition in the host to develop antimicrobials. *Nat Med*. 2018 Aug;24(8):1097–103.
57. Gardiner GE, Rea MC, O’Riordan B, O’Connor P, Morgan SM, Lawlor PG, et al. Fate of the two-component lantibiotic lactacin 3147 in the gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Nov;73(21):7103–9.
58. Naimi S, Zirah S, Hammami R, Fernandez B, Rebuffat S, Fliss I. Fate and biological activity of the antimicrobial lasso peptide microcin J25 under gastrointestinal tract conditions. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 Aug 3 ;9.
59. Forkus B, Ritter S, Vlysidis M, Geldart K, Kaznessis YN. Antimicrobial Probiotics Reduce *Salmonella enterica* in Turkey Gastrointestinal Tracts. *Sci Rep*. 2017 Jan 17;7:40695.
60. Geldart KG, Kommineni S, Forbes M, Hayward M, Dunny GM, Salzman NH, et al. Engineered *E. coli* Nissle 1917 for the reduction of vancomycin-resistant *Enterococcus* in the intestinal tract. *Bioeng Transl Med*. 2018 Sep 8;3(3):197–208.
61. Guenther K, Straube E, Pfister W, Guenther A, Huebler A. Severe sepsis after probiotic treatment with *Escherichia coli* Nissle 1917. *Pediatr Infect Dis J*. 2010 Feb 1;29(2):188-9.
62. Bonnet M, Buc E, Sauvanet P, Darcha C, Dubois D, Pereira B, et al. Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014 Feb 15;20(4):859–67.
63. Dejea CM, Fathi P, Craig JM, Boleij A, Taddese R, Geis AL, et al. Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science*. 2018 Feb 2;359(6375):592–7.

64. Johnson JR, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E. coli*”. J Lab Clin Med. 2002 Mar 1;139(3):155–62.
65. Hendrickson H. Order and disorder during *Escherichia coli* divergence. PLoS Genet. 2009 Jan;5(1):e1000335.

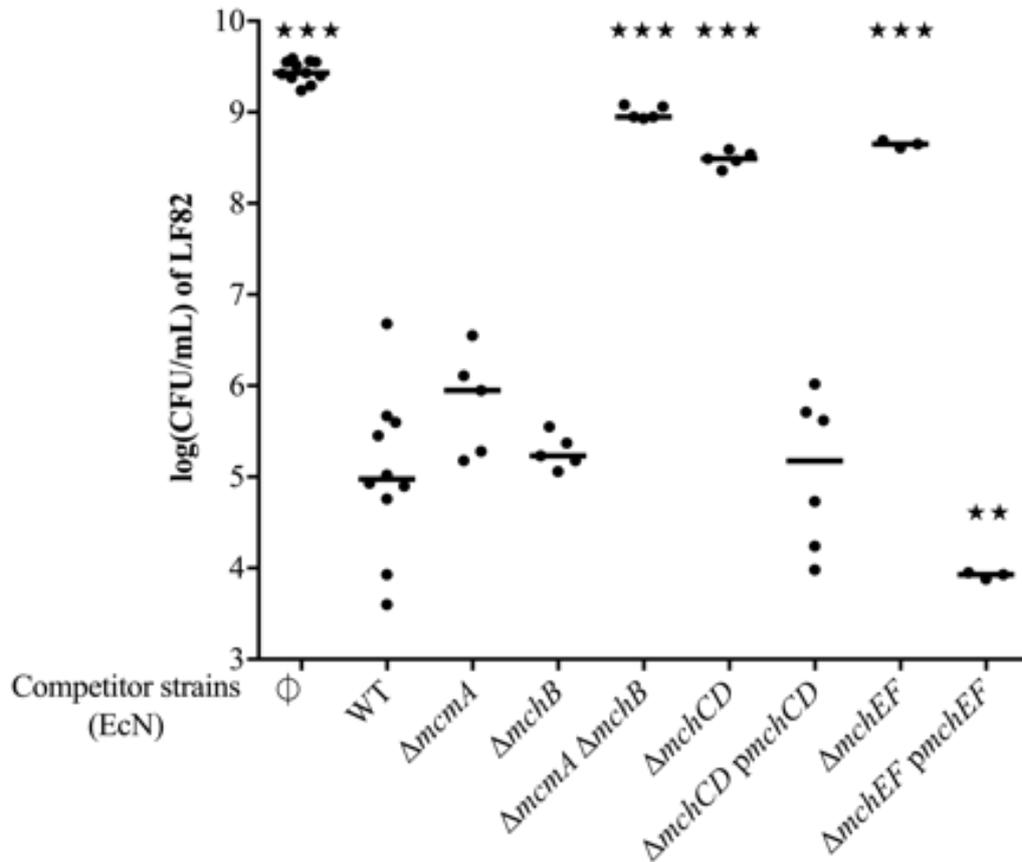
## Figures



**Fig 1. Role of the *pks/clb* island in EcN antibacterial activity on LF82.**

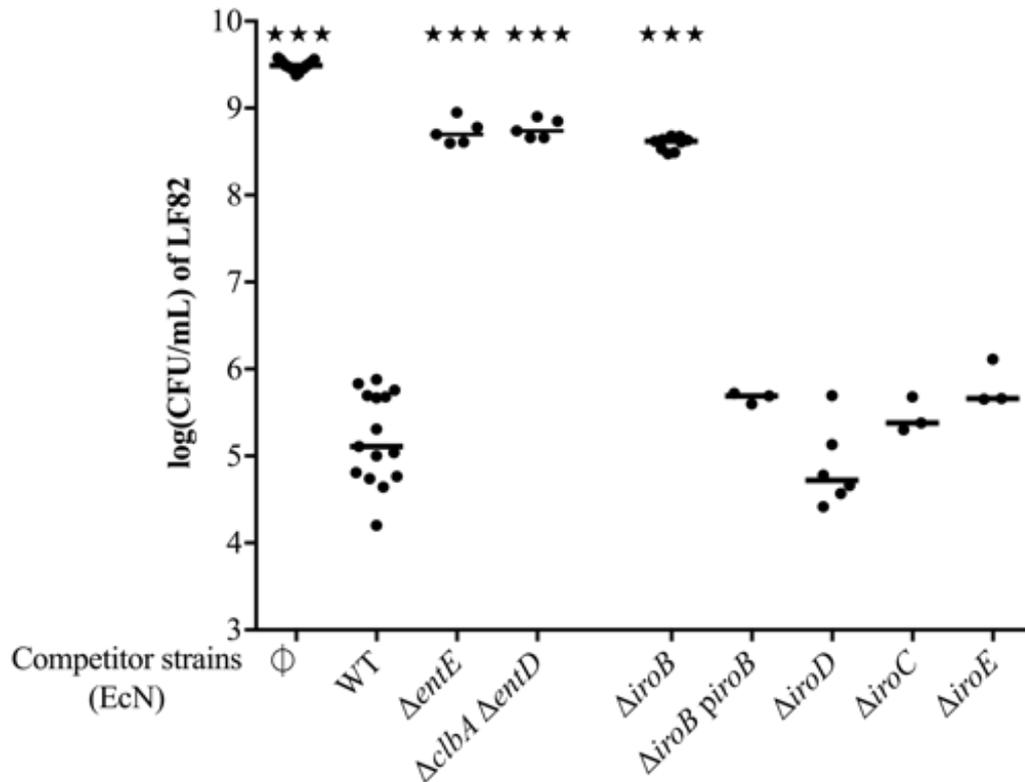
**(A)** Serial dilutions of 24-hour cocultures of *E. coli* LF82 (rifampicin resistant) with wild-type (WT) *E. coli* strain Nissle 1917 (EcN) or the mutant for the colibactin maturing peptidase ClbP, spotted (10  $\mu$ L) on LB plate containing rifampicin and incubated overnight at 37°C.

**(B)** Colony forming unit (CFU) counts of *E. coli* LF82 following a 24-hour co-culture in M63 medium with WT EcN, gene deletion for the phosphopantetheinyl transferase ClbA, the peptidase ClbP and the corresponding complemented mutant (*pclbP*), the polyketide synthases (PKS) ClbC and ClbO, the nonribosomal peptide synthases (NRPS) ClbH and ClbN, the hybrid PKS-NRPS ClbB, the putative amidase ClbL, the efflux pump ClbM, and the thioesterase ClbQ. LF82 was also cultured alone as a control ( $\emptyset$ ). The medians and individual results of independent experiments are shown. One-way ANOVA and Bonferroni post-tests in comparison with co-culture with WT;  $\star\star\star P < 0.001$ .



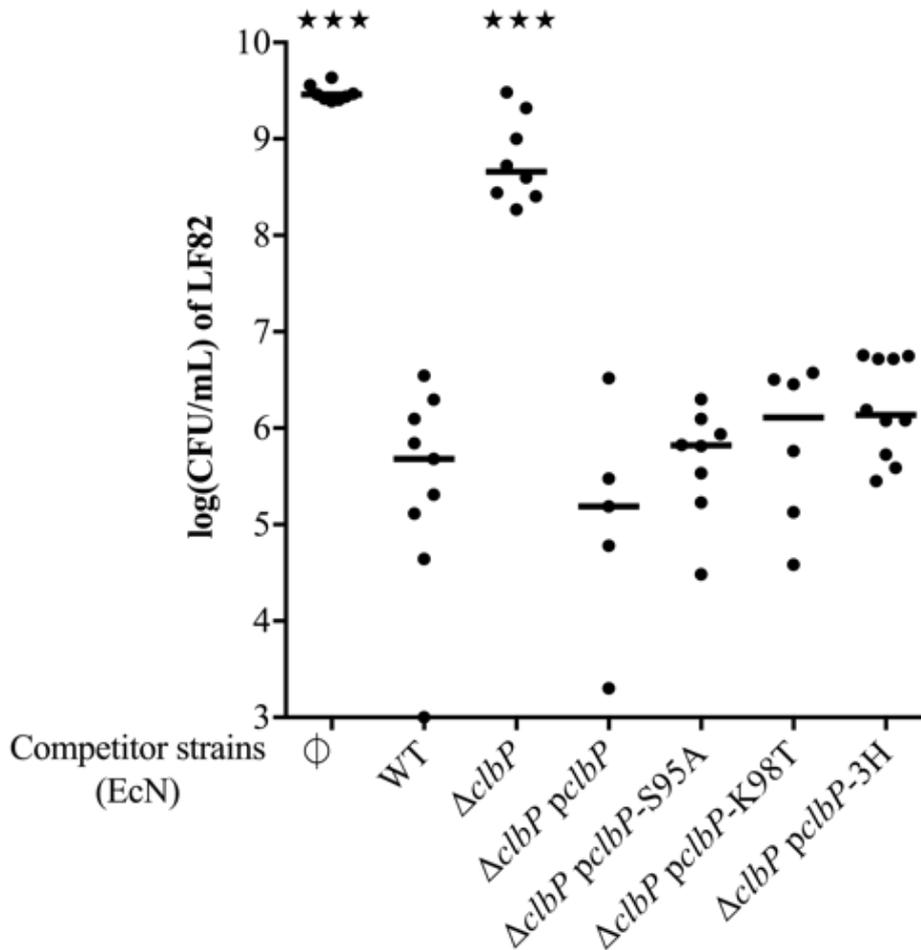
**Fig 2. Role of the microcin gene cluster in EcN antibacterial activity on LF82.**

Colony forming unit (CFU) counts of *E. coli* LF82 following a 24-hour co-culture in M63 medium with wild-type (WT) *E. coli* strain Nissle 1917 (EcN), EcN mutant for microcin M (MccM) precursor gene *mcmA*, for microcin H47 (MccH47) precursor gene *mchB*, for both *mcmA mchB* genes; EcN mutants and complemented strains for *mchC mchD* genes responsible for posttranslational modifications, and for *mchE mchF* genes that encode the MccM and MccH47 efflux pump. LF82 was also cultured alone as a control ( $\emptyset$ ). The medians and individual results of independent experiments are shown. One-way ANOVA and Bonferroni post-tests in comparison with co-culture with WT; \*\*0.001<P<0.01; \*\*\*P<0.001.



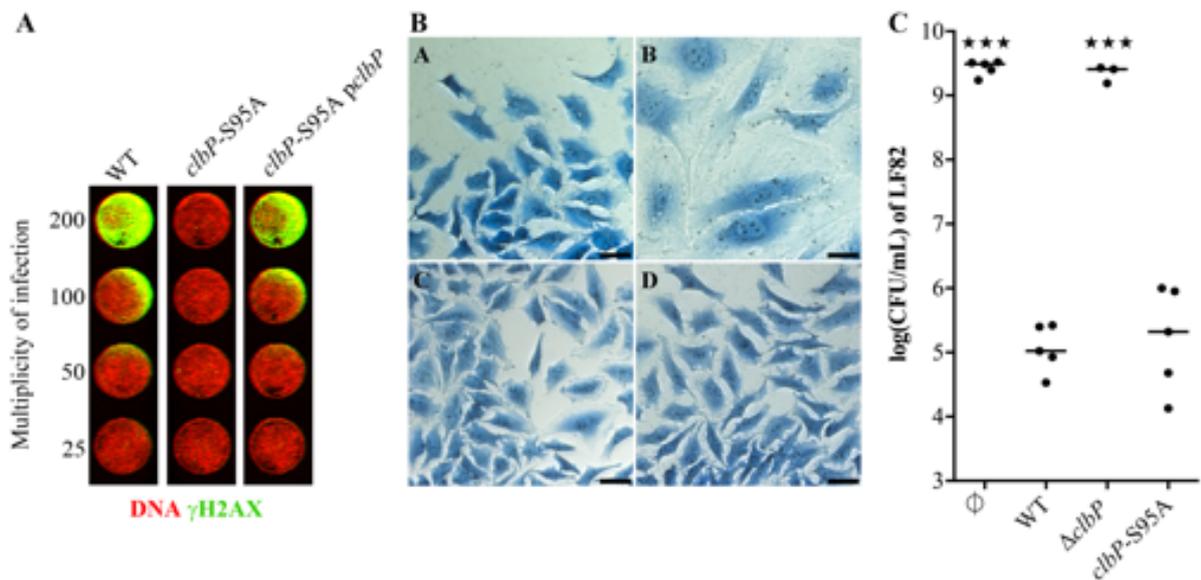
**Fig 3. Role of siderophores in EcN antibacterial activity on LF82.**

Colony forming unit (CFU) counts of *E. coli* LF82 following a 24-hour co-culture in M63 medium with wild-type (WT) *E. coli* strain Nissle 1917 (EcN), EcN mutant for *entE* that encodes the enterobactin synthase E, and the double mutant for the phosphopantetheinyl transferases ClbA and EntD; EcN mutant and complemented strain for the glucosyltransferase IroB, the cytoplasmic esterase IroD, the periplasmic esterase IroE, and the export protein IroC. LF82 was also cultured alone as a control ( $\emptyset$ ). The medians and individual results of independent experiments are shown. One-way ANOVA and Bonferroni post-tests in comparison with co-culture with WT; \*\*\* $P < 0.001$ .



**Fig 4. Role of ClbP catalytic and transmembrane domains in EcN antibacterial activity on LF82.**

Colony forming unit (CFU) counts of *E. coli* LF82 following a 24-hour co-culture in M63 medium with wild-type (WT) *E. coli* strain Nissle 1917 (EcN), the *clbP* gene deletion and complemented mutant with a plasmid that encodes wild-type ClbP (*pclbP*), plasmids that encode ClbP with a mutation S95A or K98T in the catalytic site, and a plasmid that encodes a fusion between the alkaline phosphatase PhoA and the ClbP C-terminal sequence from amino-acid 390 (*pclbP-3H*). LF82 was also cultured alone as a control ( $\emptyset$ ). Medians and individual results of independent experiments are shown. One-way ANOVA and Bonferroni post-tests in comparison with co-culture with WT; \*\*\* $P < 0.001$

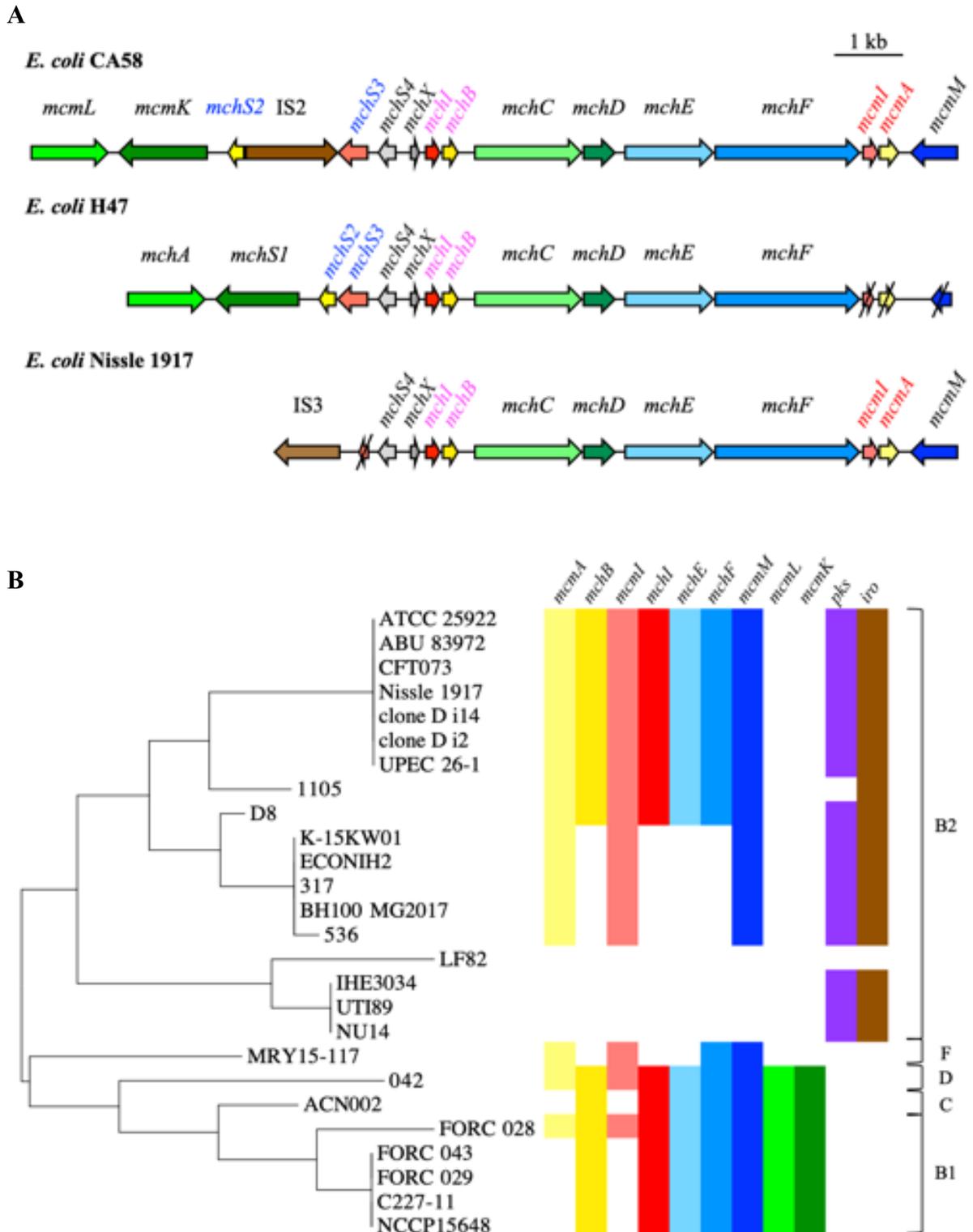


**Fig 5. A genomic point mutation that inactivates ClbP catalytic domain abrogates EcN genotoxicity but not the antibacterial activity on LF82.**

**(A)** HeLa cells were transiently infected with wild-type *E. coli* Nissle (WT), a genome edited mutant with a single chromosomal nucleotide change in the *clbP* gene that inactivates the catalytic site (*clbP-S95A*), and the genome edited mutant complemented with the plasmid *p<sub>clbP</sub>*. Cells were then fixed, permeabilized and stained with rabbit monoclonal anti-gamma-H2AX followed by an infrared fluorescent secondary antibody (pseudocolored in green). DNA was counterstained with RedDot2.

**(B)** HeLa cells were transiently infected with wild-type *E. coli* Nissle (photo B), a *clbP* gene deletion mutant (C), and the genome edited *clbP-S95A* mutant (D). These cells were then washed and incubated with gentamicin for 72 hours before staining with Giemsa. The control is shown in photo A. Bars represent 50  $\mu$ m.

**(C)** Colony forming unit (CFU) counts of *E. coli* LF82 following a 24-hour co-culture in M63 medium with wild-type (WT) *E. coli* strain Nissle 1917 (EcN), the *clbP* gene deletion mutant ( $\Delta clbP$ ), and the genome edited mutant with a single nucleotide change in the *clbP* gene that results in an S95A mutation in the catalytic site (*clbP-S95A*). LF82 was also cultured alone as a control ( $\emptyset$ ). Medians and individual results of independent experiments are shown. One-way ANOVA and Bonferroni post-tests in comparison with co-culture with WT;  $\star\star\star P < 0.001$

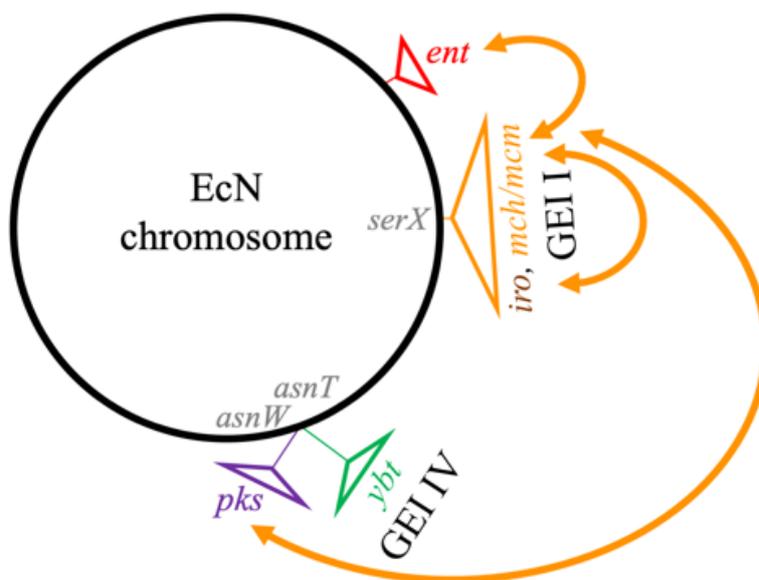


**Fig 6. Organization and distribution of microcin, *pks* and *iro* islands in *E. coli*.**

**(A)** Microcin (Mcc) gene clusters in *Escherichia coli* CA58, H47 and Nissle 1917 (EcN) (modified from Vassiliadis G. *et al.*, 2010). Mcc precursor genes, immunity genes, and genes involved in Mcc export and posttranslational modifications are indicated in yellow, red, blue and green, respectively. Truncated genes in *E. coli* H47 and EcN are

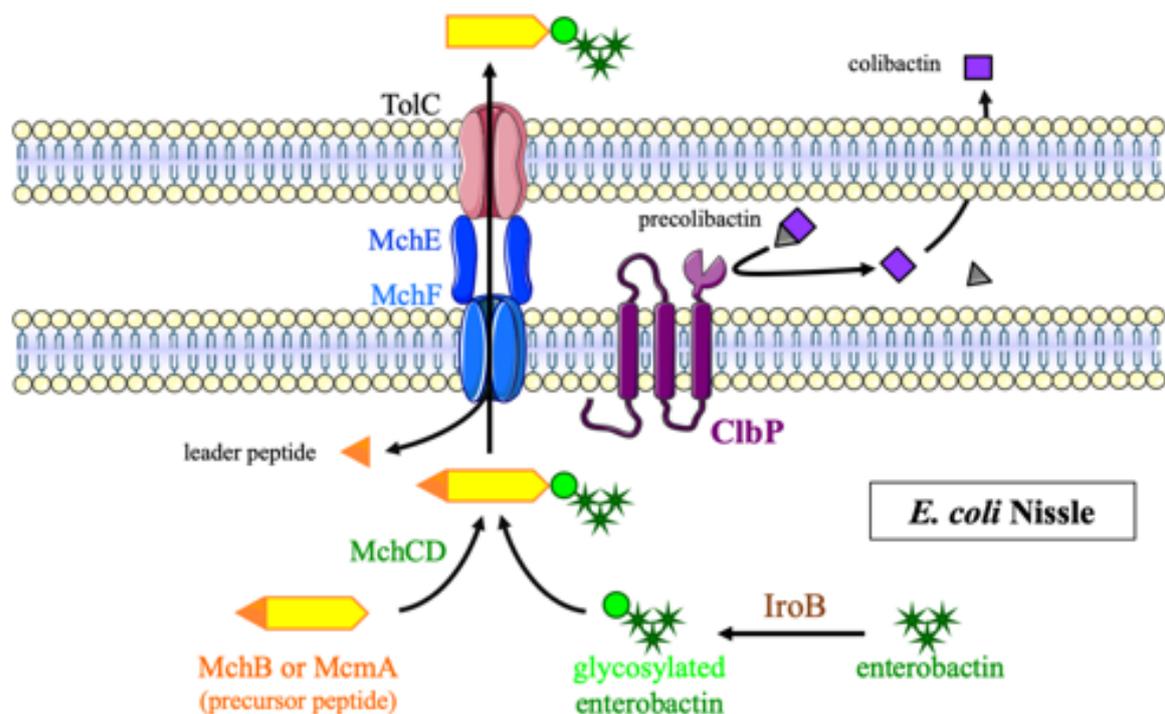
shown with slashes. The names of the genes specifically involved in MccM, MccH47, and MccI47 are in red, pink, and blue respectively.

**(B)** Phylogenetic relationships between *E. coli* strains that carry siderophore-Mcc, colibactin (*pks*) and salmochelin (*iro*) synthesis gene clusters. The phylogenetic group of the strains is shown together with the phylogeny that was determined based on the housekeeping gene *rpoC*. The presence of Mcc precursor genes (*mcmA*, *mchB*), immunity genes (*mcml*, *mchl*), genes involved in Mcc export (*mchE*, *mchF*, *mcmM*) and genes involved in posttranslational modifications (*mcmL*, *mcmK*) are indicated with the same colour code as in Fig 6.A.



**Fig 7. Gene clusters involved in the production of microcins H47 and M (MccH47 and M) in *E. coli* strain Nissle (EcN) represented on a genomic map.**

The loci that encode enterobactin (*ent*), colibactin (*pks*), yersiniabactin (*ybt*) on EcN genomic island (GEI) IV, salmochelin (*iro*) and MccH47 (*mch*) and M (*mcm*) on GEI I are represented. The arrows represent the interplays between the different gene clusters involved in MccH47 and M production in EcN.



**Fig 8. Model proposed for biosynthesis of siderophore-microcins H47 and M in *E. coli* Nissle.**

An enterobactin precursor is modified by the enterobactin glucosyltransferase IroB. This siderophore moiety is transferred onto the C-terminal extremity of the precursor peptide by the MchCD complex. The active form of the siderophore-microcin is the result of the leader peptide cleavage during its export by the specific efflux pump MchEF-TolC. The C-terminal domain of ClbP allows this final step of siderophore-microcin production, while its N-terminal enzymatic domain cleaves precolibactin to produce colibactin.

## Supporting Information

**Table S1. Strains and plasmids used in this study.**

Strain or plasmid	Genotype or phenotype	Source or reference
<i>E. coli</i> Nissle (EcN)	Probiotic strain; colibactin genotoxin producer; enterobactin and salmochellin siderophores producer; microcins H47 and M producer	DSM 6601, Mutaflor <sup>®</sup>
EcN WT	EcN mutant in <i>rpsL</i> , Str <sup>R</sup>	[1,2]
EcN $\Delta clbA$	<i>clbA</i> mutant of strain EcN WT, Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	[1]
EcN $\Delta clbB$	<i>clbB</i> mutant of strain EcN WT, Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	[3]
EcN $\Delta clbC$	<i>clbC</i> mutant of strain EcN, Str <sup>R</sup> , Chl <sup>R</sup>	[3]
EcN $\Delta clbH$	<i>clbH</i> mutant of strain EcN WT, Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta clbL$	<i>clbL</i> mutant of strain EcN WT, Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta clbM$	<i>clbM</i> mutant of strain EcN WT, Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta clbN$	<i>clbN</i> mutant of strain EcN WT, Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	[3]
EcN $\Delta clbO$	<i>clbO</i> mutant of strain EcN WT, Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta clbP$	<i>clbP</i> mutant of strain EcN WT, Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	[3]
EcN $\Delta clbP$ <i>pclbP</i>	EcN $\Delta clbP$ mutant complemented with <i>pBRSKpclbP</i> , Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Carb <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta clbP$ <i>pclbP</i> -S95A	EcN $\Delta clbP$ mutant complemented with <i>pclbP</i> -S95A, Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Carb <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta clbP$ <i>pclbP</i> -K98T	EcN $\Delta clbP$ mutant complemented with <i>pclbP</i> -K98T, Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Carb <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta clbP$ <i>pclbP</i> -3H	EcN $\Delta clbP$ mutant complemented with <i>pclbP</i> -3H	This study
EcN <i>clbP</i> -S95A	EcN <i>clbP</i> -S95A chromosomal isogenic mutant	This study
EcN $\Delta clbQ$	<i>clbQ</i> mutant of strain EcN WT, Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta mcmA$	<i>mcmA</i> mutant of EcN WT, Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta mchB$	<i>mchB</i> mutant of EcN WT, Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta mcmA\Delta mchB$	<i>mcmA mchB</i> mutant of EcN WT, Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta mchCD$	<i>mchC mchD</i> mutant of EcN WT, Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta mchCD::FRT$	<i>mchCD::FRT</i> mutant of strain EcN WT, Str <sup>R</sup>	This study

EcN $\Delta mchCD$ <i>pmchCD</i>	EcN $\Delta mchCD::FRT$ complemented with TopoXL <i>mchCD</i> , Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta mchEF$	<i>mchE mchF</i> mutant of EcN WT, Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta mchEF::FRT$	<i>mchEF::FRT</i> mutant of strain EcN WT, Str <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta mchEF$ <i>pmchEF</i>	EcN $\Delta mchEF::FRT$ complemented with TopoXL <i>mchEF</i> , Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta entE$	<i>entE</i> mutant of EcN WT, Str <sup>R</sup> , Chl <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta entD$	<i>entE</i> mutant of EcN WT, Str <sup>R</sup> , Chl <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta entD\Delta clbA$	<i>clbA</i> , <i>entE</i> mutant of EcN WT, Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta iroB$	<i>iroB</i> mutant of EcN WT, Str <sup>R</sup> , Chl <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta iroB$ <i>piroB</i>	EcN $\Delta iroB$ mutant complemented with pASK75 <i>iroB</i>	This study
EcN $\Delta iroC$	<i>iroC</i> mutant of EcN WT, Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta iroD$	<i>iroD</i> mutant of EcN WT, Str <sup>R</sup> , Chl <sup>R</sup>	This study
EcN $\Delta iroE$	<i>iroE</i> mutant of EcN WT, Str <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	This study
<i>E. coli</i> LF82	Strain isolated from an ileal biopsy of a patient with Crohn's disease; adherent-invasive <i>E. coli</i> , Rif <sup>R</sup>	[4]
LF82 pMcMi	LF82 carrying pMcMi, Rif <sup>R</sup> , Carb <sup>R</sup>	This study
LF82 pMcHi	LF82 carrying pMcHi, Rif <sup>R</sup> , Carb <sup>R</sup>	This study
<i>E. coli</i> M1/5	Commensal <i>E. coli</i> strain isolated from feces of a healthy adult; B2 phylogenetic group; colibactin genotoxin producer; aerobactin, enterobactin and yersiniabactin siderophores producer	[5]
M1/5 $\Delta clbP$	<i>clbP</i> mutant of strain M1/5, Kan <sup>R</sup>	[6]
<i>E. coli</i> SP15	Strain isolated from spinal fluid of a neonate with meningitis; O18:K1 serotype; colibactin genotoxin producer; aerobactin, enterobactin, salmochelins and yersiniabactin siderophores producer	[7]
SP15 $\Delta clbP$	<i>clbP</i> mutant of strain SP15, Kan <sup>R</sup>	This study
<i>E. coli</i> NC101	Non-pathogenic murine <i>E. coli</i> strain; colibactin genotoxin producer;	[8,9]
NC101 $\Delta clbP$	<i>clbP</i> mutant of strain NC101, Kan <sup>R</sup>	[10]
<i>E. coli</i> MG1655 <i>bacpks</i>	Enterobactin siderophore producer <i>E. coli</i> strain carrying a bacterial artificial chromosome bearing the <i>pks</i> island, Chl <sup>R</sup>	[11]

MG1655 <i>bacpks</i> $\Delta clbP$	<i>clbP</i> mutant of strain MG1655 <i>bacpks</i> , $Chl^R$	This study
<i>E. coli</i> CFT073	Strain isolated from a patient with pyelonephritis, colibactin genotoxin producer; enterobactin siderophores producer; microcins H47 and M producer	[12]
CFT073 $\Delta clbP$	<i>clbP</i> mutant of strain CFT073, $Kan^R$	This study
CFT $\Delta clbP$ <i>pclbP</i>	CFT073 $\Delta clbP$ mutant complemented with <i>pBRSKpclbP</i> , $Kan^R$ , $Carb^R$	This study
<i>E. coli</i> ABU83972	Strain isolated from a patient with asymptomatic bacteriuria, colibactin genotoxin producer; enterobactin siderophores producer; microcins H47 and M producer	[13,14]
ABU83972 $\Delta clbP$	<i>clbP</i> mutant of strain ABU83972, $Kan^R$	This study
ABU83972 $\Delta clbP$ <i>pclbP</i>	ABU83972 $\Delta clbP$ mutant complemented with <i>pBRSKpclbP</i> , $Kan^R$ , $Carb^R$	This study
<i>E. coli</i> ATCC <sup>®</sup> 25922	Strain isolated from a patient in Seattle (1946), colibactin genotoxin producer; enterobactin siderophores producer; microcins H47 and M producer	DSM1103
ATCC <sup>®</sup> 25922 $\Delta clbP$	<i>clbP</i> mutant of strain ATCC <sup>®</sup> 25922, $Kan^R$	This study
ATCC <sup>®</sup> 25922 $\Delta clbP$ <i>pclbP</i>	ATCC <sup>®</sup> 25922 $\Delta clbP$ mutant complemented with <i>pBRSKpclbP</i> , $Kan^R$ , $Carb^R$	This study
<i>E. coli</i> ST131 isolate JJ1886	Strain isolated in the USA (2007) from a patient with fatal urosepsis, $Str^R$ , $Kan^R$ , $Carb^R$ , $Chl^R$	[15]
<i>E. coli</i> NRG857c	Strain isolated from the ileum of a Crohn's Disease patient, $Carb^R$ , $Chl^R$	[16]
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium IR715	$Nal^R$ derivative of <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium ATCC14028	[17]
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC <sup>®</sup> 13048	Strain isolated from sputum in the USA (Center for Disease Control and Prevention)	ATCC <sup>®</sup> 13048
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC <sup>®</sup> 13182	Strain isolated from a pharyngeal tonsil	ATCC <sup>®</sup> 13182
<i>pclbP</i>	<i>pBRSK</i> encoding <i>clbP</i> sequence	[18]
<i>pclbP</i> -S95A	<i>pBRSK</i> encoding the mutant S95A of <i>ClbP</i> ( <i>pOB902</i> ), $Carb^R$	[18]

<i>pclbP</i> -K98T	pBRSK encoding the mutant K98T of ClbP (pOB903), Carb <sup>R</sup>	[18]
<i>pclbP</i> -3H	pASK74 carrying the fusion between ClbP N-terminal signal sequence, the alkaline phosphatase PhoA, and the 3 transmembrane helices of ClbP, Carb <sup>R</sup>	This study
<i>pmchCD</i>	pCR XL-TOPO vector encoding <i>mchC</i> and <i>mchD</i> from EcN, Kan <sup>R</sup>	This study
<i>pmchEF</i>	pCR XL-TOPO vector encoding <i>mchE</i> and <i>mchF</i> from EcN, Kan <sup>R</sup>	This study
pMcMi	Carrying <i>mcmI</i> from MccM gene cluster, Carb <sup>R</sup>	F. Moreno, unpublished data [19]
pMcHi	Carrying <i>mchI</i> from MccH47 gene cluster, Chi <sup>R</sup>	F. Moreno, unpublished data, [19]

**Table S2. Primers used in this study.**

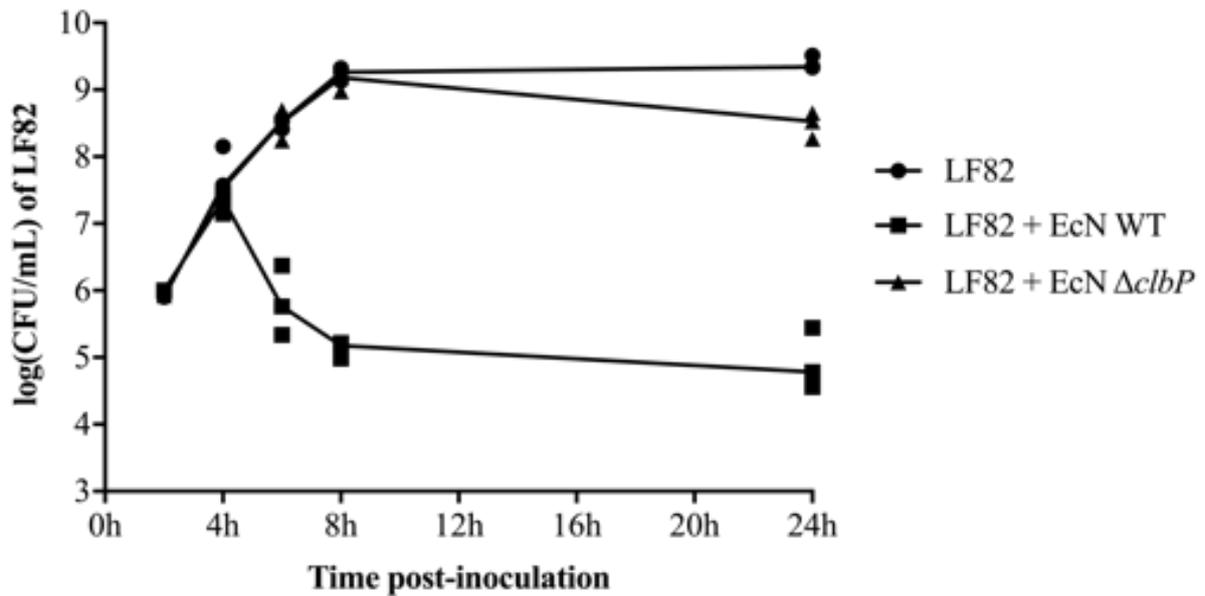
Primer	Aim	Primer sequence (5'-3')
dmcmA_F	Delete <i>mcmA</i>	TTAAACGTGAATTTTTACTTCTTCACAAATCTT ATAGCGAAGGTGTTGAAGCTGGAGCTGCTTC
dmcmA_R		TATCATATAATGAAGCACCTGTAACAGGTGCT TCATTAACAATATAAGGTCATATGAATATCCTC CTTAG
VmcmA_F	Verify <i>mcmA</i> deletion	CGTTGAGAACTGTTGACAGG
VmcmA_R		AAGCGTTACATAGGCACCAT
dmchB_F	Delete <i>mchB</i>	TCTGGTCTGGTCAGGCTGGAAAAACGGAAGTT AAATATGATGGAGTTTATGCTGGAGCTGCTTC
dmchB_R		ATTTTACAGGTACTACCGAAAAAGTACCTGTA AAATAAATAAAAAATAACATATGAATATCCTC CTTAG
VmchB_F	Verify <i>mchB</i> deletion	GTTTCACTTTCATCCCTTCG
VmchB_R		GAGCAAGTAAGTGTCTGAC
dmchCD_F	Delete <i>mchC</i> and <i>mchD</i>	AACACTCTTTTATGAAAATTGAAACGGAGAAT ACTGCCAGGCTGGAGCTGCTTC
dmchCD_R		TACCCCGTAATTTACAATTATCTCTGTATCTTC AGAGGTACATATGAATATCCTCCTTA
VmchCD_F	Verify <i>mchC</i> <i>mchD</i> deletion, transpose <i>mchC</i> <i>mchD</i> for complementation	AGTGGTAGTGCCAGTTCTTC
VmchCD_R		TGCTTCCCAGCATGATTAAC
dmchEF_F	Delete <i>mchE</i> and <i>mchF</i>	AGCTATTTTGTTCGTCAGGATGCTTTAGAAA ACAGAAAAGCTGGAGCTGCTTC
dmchEF_R		CCATCGACAAAACCTCCTTACAAAGTTACACCA GTGGATTTTCATATGAATATCCTCCTTA
VmchEF_F	Verify <i>mchE</i> , <i>mchF</i> deletion, transpose <i>mchE</i> , <i>mchF</i> for complementation	CGCAGATCTCCTCTGAAGATACAGAGAT
VmchEF_R		CCCAAGCTTCCATAGTAATAACTAAGAT
JPN42 [11]	Verify and transpose <i>clbA</i> deletion	CAGATACACAGATACCATTCA
JPN46 [11]		CTAGATTATCCGTGGCGATTC
dPCPclbH_F	Delete ClbH peptidyl carrier protein (PCP) domain	GGCCGGGCGAGTATGTCCCTCCGGCAACCG AACTGGAACAGCGTCTGGCGGCTGGAGCTG CTTC
dPCPclbH_R		ACGTGCTGACCGCACTGCTGCCGATGTATT GCTGCATCTGTACTAGCAGCATATGAATATCC TCCTTAG
VPCPclbH_F	Verify deletion of ClbH PCP domain	GCAGTGGTTAACGGTTATGG
VPCPclbH_R		GGAATCAGTGATGACTGTCCG
IHAPJPN61 [20]	Verify and transpose <i>clbL</i> deletion	CAACTGCACAATCTACCCGCC
IHAPJPN62 [20]		GCTGTCACCGATATCCGCCTC

dclbM_F	Delete <i>clbM</i>	CCATCGGCATGCAGCGGTTGGATCGTGACAG GCGGATTTTTGTCCGGTCCGGTATCATCATCGCG CTATTCTT
dclbM_R		CAATGTGTAGATGAAATAGGCGACCATACTCA GTTGCGCCAGAAACGACGCCAATGCCACCCC TTTCACA
AS60	Verify <i>clbM</i> deletion	GGTGACAGCGCCAATAAAG
AS140		GATGTGGCACTGTTCTCTG
IHAPJPN29 [20]	Verify and transpose <i>clbP</i> deletion	GTGAACTGAGCGAAATATTGGCTAATC
IHAPJPN30 [20]		TTACTCATCGTCCCACTCCTTGTTG
PB- clbP_pASK75_F	Amplify ClbP signal sequence with overlapping primers for pASK and PhoA	CGGTACCCGGGGATCCATGACAATAATGG
PB- clbPps_phoA_R		CAGGCATCGCCCCGATAGGCTCATG
PB- phoA_clbPps_F	Amplify the enzymatic domain of the alkaline phosphatase PhoA with primers overlapping ClbP signal sequence and C-terminal sequence	CCTATCGGGGCGATGCCTGTTCTGGAAAACC
PB- phoA_clbP3H_R		CGCAACGCAATTTTCAGCCCCAGAGCGGC
PB- clbP3H_phoA_F	Amplify the 3 C-terminal transmembrane helices of ClbP with primers overlapping PhoA and pASK75 sequences	GGGCTGAAAATTGCGTTGCGACCGGATCAG
PB- clbP3H_pASK7 5_R		GTCGACCTCGAGTTACTCATCGTCCCACTCC
PB- pASK75_clbP3 H_F	Amplify pASK75 sequence with primers overlapping ClbP signal sequence and C-terminal sequence	GATGAGTAACTCGAGGTCGACCTGCAGGCAG
PB- pASK75_clbPps _R		CCATTATTGTCATGGATCCCCGGGTACCG
IRSDNG26	Insert the S95A mutation in the <i>clbP</i> gene sequence	CCTGAATCAGTATTTGCACCACAAGTCCGGTA AACGCCTTACTCATCCGTCCCAGCTCGTAAA CTGTGTCTAGAGTATTCGCTTTCTGAC
IHAPJPN55 [20]	Verify and transpose <i>clbQ</i> deletion	TTATCCTGTTAGCTTTCTGTTT
IHAPJPN56 [20]		CTTGTATAGTTACACAACCTATTTC
entD-P1 [11]	Delete <i>entD</i>	GGGCGGATCGCTGCAATTTATGCGCTGCGG GAATATGGCTATAAATGTGTGCGTGTAGGCT GGAGCTGCTTC
entD-P2 [11]		TCACTTGCCCTAAATGCGCTCTCTTTGGCGGA AAATGCCAGTGTGAGCGCCATATGAATATCCT CCTTAG

entE-P1 [11]	Delete <i>entE</i>	TATCGACGGCGAGCGACAGTTGAGTTATCGG GAGCTGAATCAGGCGGCGTGTAGGCTGGAG CTGCTTC
entE-P2 [11]		AAGCGCAGCTTTTTTCGCCATCAGCTCATCT TCCATGCTCACCAGTGCCATATGAATATCCTC CTTAG
diroB_F	Delete <i>iroB</i>	CATGACTCCTGGATGGGGGCTGGCAAATGAT TATCATGAAGGTGTAGTGGGCTGGAGCTGCT TC
diroB_R		GAGTGCCTCGACTGCCTGATTTAGATCGTCA AGCGGAGAGGGATTTTCTCCATATGAATATCC TCCTTAG
ViroB_F	Verify <i>iroB</i> deletion	CCACGATGACACTAAGTTTC
ViroB_R		AAAGTCGTGTCCTGCTGCTG
IRSD NG7	Transpose <i>iroB</i> into pBbA5a-RFP	GCTTTAGAATTCTTTAGATCGTCAAGCGGAGA GG
IRSD NG8		CTTTAGGATCCCTACCCTTTCTGTACCATTGTG
diroC_F	Delete <i>iroC</i>	ACGGTACCGCCGCTTCTGACTGTGTTTTAAT ACATTACGTGTCCAGTAAGCTGGAGCTGCTTC
diroC_R		GGCGAAAAGCCTGATCACAATGGTACAGAAA GGGTAGCCACTACACCTTCCATATGAATATCC TCCTTAG
ViroC_F	Verify <i>iroC</i> deletion	CCAGAAGTCAGTAAGGTTAGC
ViroC_R		GGTGAAGTGGCGAAAAG
diroD_F	Delete <i>iroD</i>	GATTTATTCAGGAAGTCTGTACCGTTTCCTGA AAGTGTGTTGTGGGTCAACGCTGGAGCTGCTTC
diroD_R		TAGCCGCTTTAATTATTTATACTGACATCCT TAATTTTTAAAGAGTATGACATATGAATATC CTCCTTAG
ViroD_F	Verify <i>iroD</i> deletion	CAGGAAGTCTGTACCGTTTCC
ViroD_R		ATCGCCAGCACACATGAAG
diroE_F	Delete <i>iroE</i>	TTAGTGGCTTAACTCATGACAACCTGCTGT GTAATTTGCGTTTTCCACTGCATATGAAT ATCCTCCTTAG
diroE_R		ATGTATGCCCGCGAGTATCGCTCAACACGC CCGCATAAAGCGATTTTCTTTCCGTGTAGG CTGGAGCTGCTTC
ViroE_F	Verify <i>iroE</i> deletion	GAGTTACCGCATCATTCTGA
ViroE_R		TTGTCACCTGCGGAAAAGG

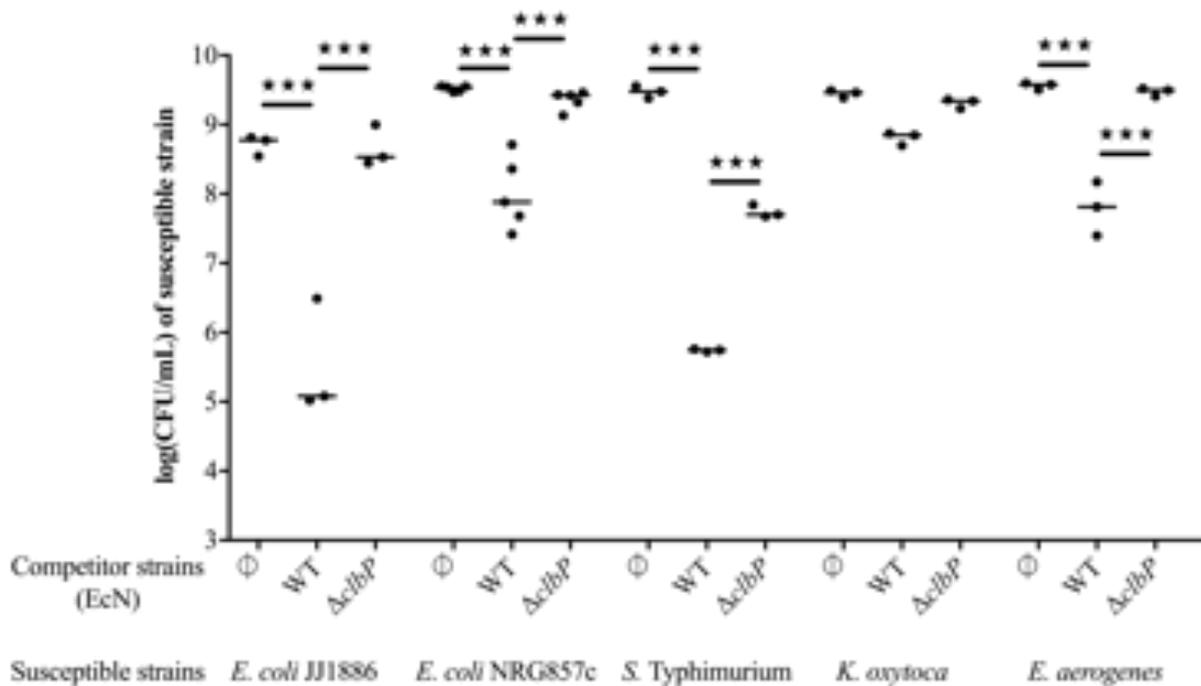
**Table S3. Genbank accession numbers for genome sequences included in Figure 6B**

<b>Strain</b>	<b>Accession number</b>
<i>E. coli</i> str. 042	FN554766.1
<i>E. coli</i> str. 317	CP023357.1
<i>E. coli</i> str. 536	CP000247.1
<i>E. coli</i> str. 1105	CP023388.1
<i>E. coli</i> str. ABU83972	CP001671.1
<i>E. coli</i> str. ACN002	CP007491.1
<i>E. coli</i> str. ATCC®25922	CP009072.1
<i>E. coli</i> str. BH100 MG2017	CP025251.1
<i>E. coli</i> str. CFT073	AE014075.1
<i>E. coli</i> clone D i2	CP002211.1
<i>E. coli</i> clone D i14	CP002212.1
<i>E. coli</i> str. D8	CP010151.1
<i>E. coli</i> str. ECONIH2	CP014667.1
<i>E. coli</i> str. FORC_028	CP012693.1
<i>E. coli</i> str. FORC_029	CP013185.1
<i>E. coli</i> str. FORC_043	CP016828.1
<i>E. coli</i> str. IHE3034	CP001969.1
<i>E. coli</i> str. K-15KW01	CP016358.1
<i>E. coli</i> str. LF82	CU651637.1
<i>E. coli</i> str. MRY15-117	AP017617.1
<i>E. coli</i> str. NCCP15648	CP009050.1
<i>E. coli</i> str. Nissle 1917	CP007799.1
<i>E. coli</i> str. NU14	CP019777.1
<i>E. coli</i> str. O104:H4 str. C227-11	CP011331.1
<i>E. coli</i> str. UPEC 26-1	CP016497.1
<i>E. coli</i> str. UTI89	CP000243.1



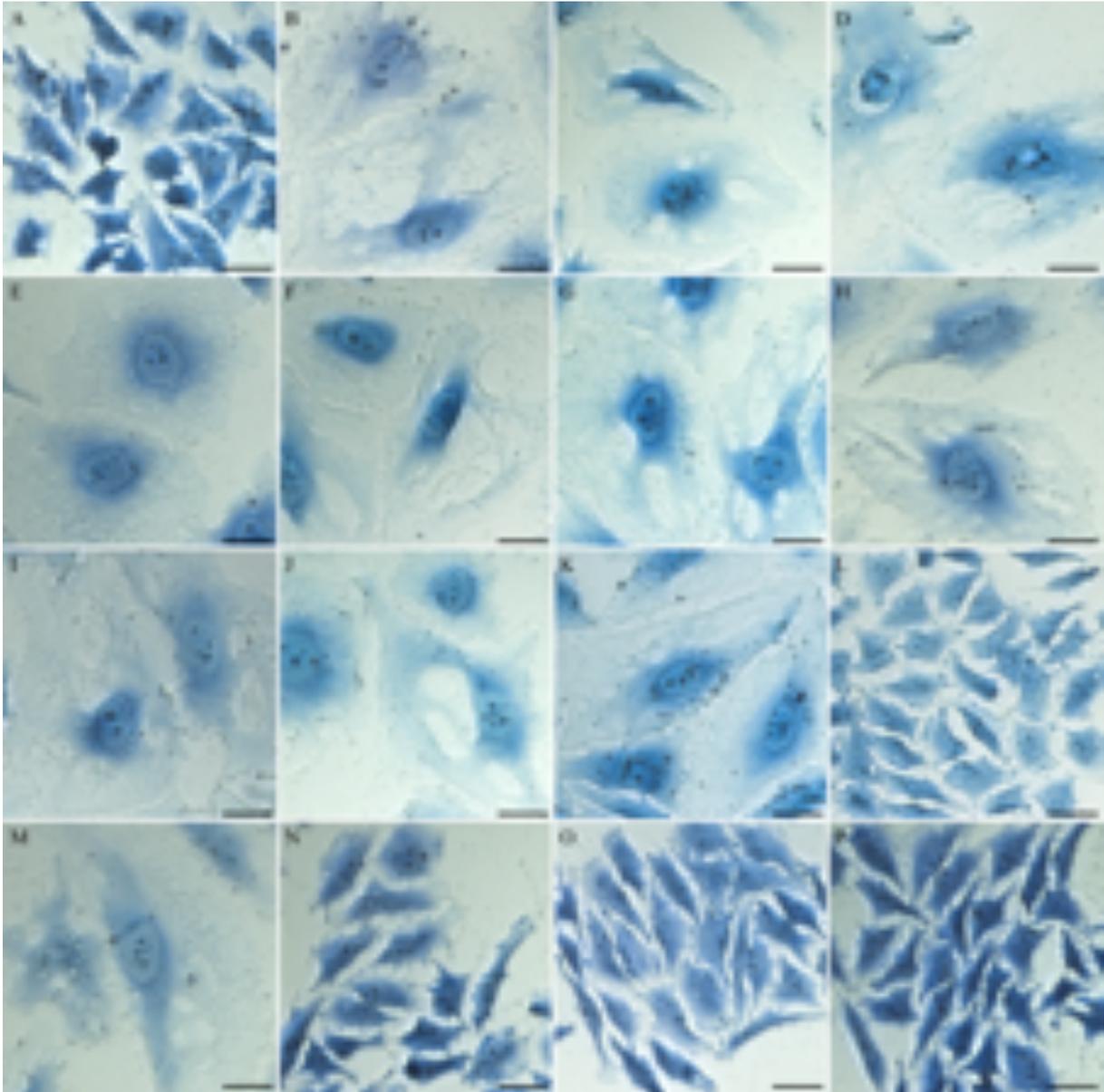
**Figure S1. *In vitro* growth curves of *E. coli* LF82 when grown alone or in competition with *E. coli* Nissle wild type or  $\Delta clbP$  mutant.**

Colony forming unit (CFU) counts of *E. coli* LF82 following a 2, 4, 6, 8, and 24-hour co-culture in M63 medium with the wild-type (WT) *E. coli* strain Nissle 1917 (EcN) or the mutant for colibactin maturing peptidase ClbP ( $\Delta clbP$ ). LF82 was also cultured alone as a control. The individual results of the 3 independent experiments are shown and the medians for each time point are linked.



**Figure S2. *E. coli* Nissle ClbP-dependent antagonistic activity against phylogenetically-related enterobacteria.**

Colony forming unit (CFU) counts of *E. coli* ST131 isolate JJ1886, *E. coli* NRG857c, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium IR715, *Enterobacter aerogenes* ATCC®13048, and *Klebsiella oxytoca* ATCC®13182 after a 24-hour co-culture in Dulbecco's Modified Eagle Medium with wild-type (WT) *E. coli* strain Nissle (EcN), and EcN  $\Delta clbP$  mutant. All susceptible strains were also cultured alone as controls ( $\emptyset$ ). The medians and individual results of independent experiments are shown. One-way ANOVA and Bonferroni post-tests; \*\*\*P<0.001.

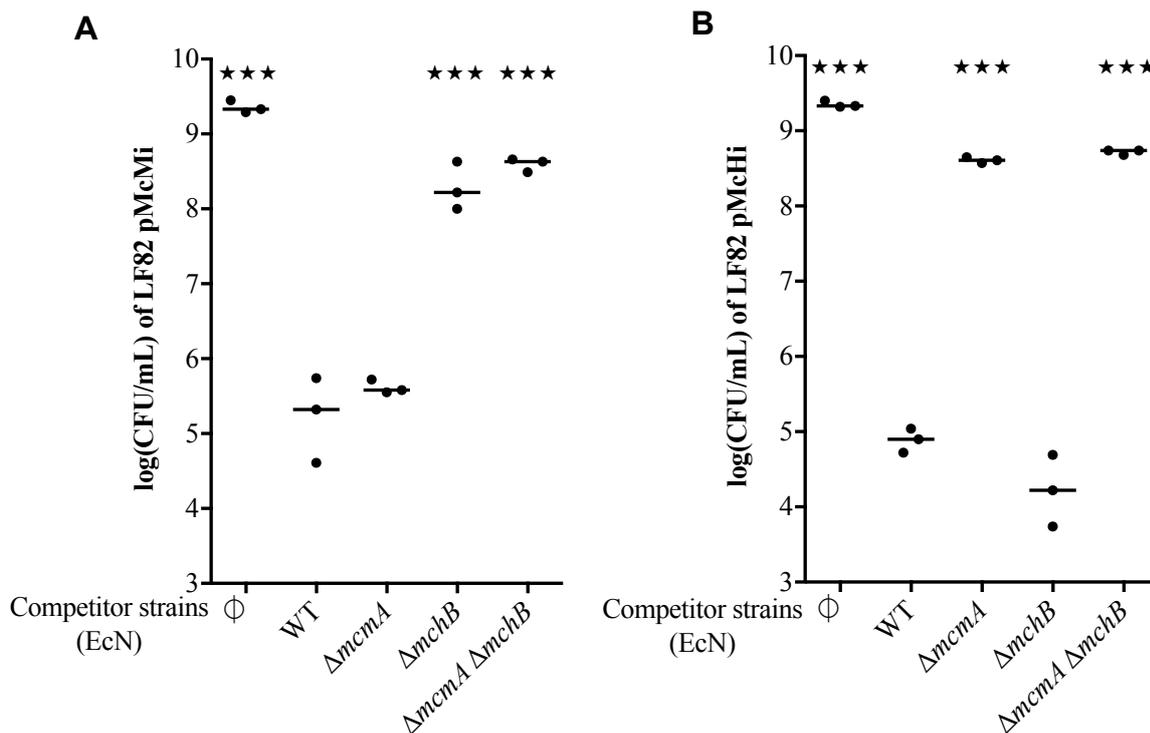


**Figure S3. Cytopathic activity of *E. coli* Nissle mutants in the microcin and salmochelin production systems, and in ClbP catalytic site.**

HeLa cells were transiently infected with wild-type (WT) *E. coli* strain Nissle (EcN) (B) and various mutants then washed and incubated with gentamicin for 72 hours before staining with Giemsa. The control is shown in A. Bars represent 50  $\mu$ m.

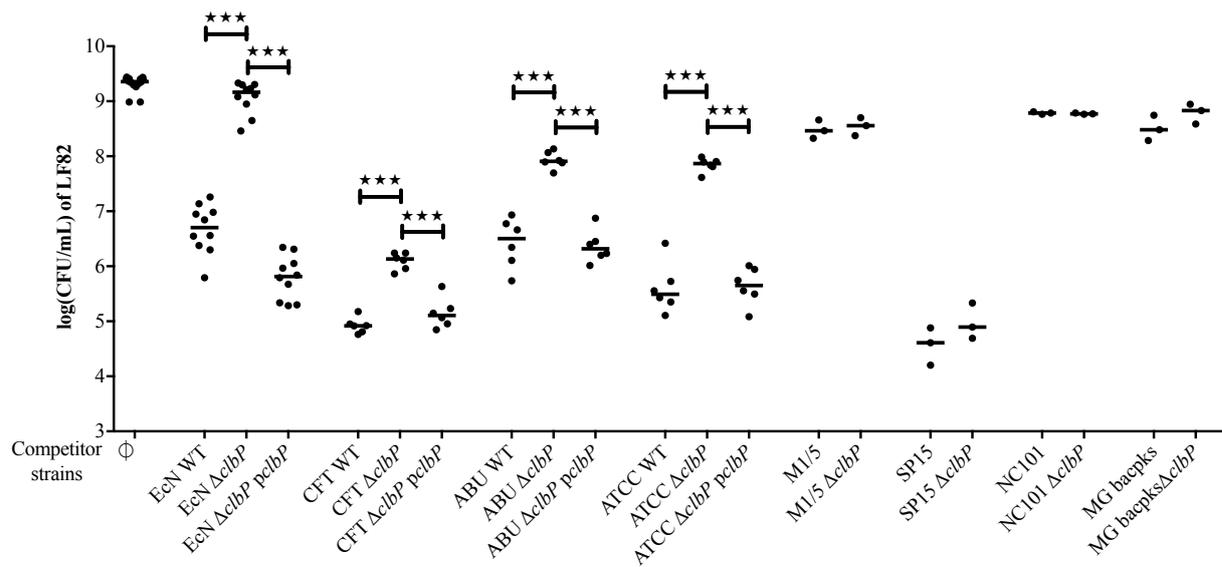
Mutations in the EcN microcin gene cluster did not abrogate EcN cytopathic activity: EcN mutants for C. *mcmA*; D. *mchB*; E. *mcmAmchB*; F. *mchCD*; G. *mchEF*. Mutations in the EcN salmochelin gene cluster did not abrogate EcN cytopathic activity: EcN mutants for H. *iroB*; I. *iroC*; J. *iroD*; K. *iroE*. EcN  $\Delta clbP$  mutant (L) did not affect cells, whereas *clbP* complementation restored the cytopathic activity (M). Complementation of EcN  $\Delta clbP$  mutant with a plasmid encoding ClbP with an S95A mutation (N), a K98T

mutation (O) did not restore the cytopathic activity, as well as complementation with the plasmid encoding the fusion between alkaline phosphatase and the C-terminal domain of ClbP (P).



**Figure S4. *E. coli* Nissle antagonistic activity against LF82 carrying microcin M (Supp. Fig. 4A) or microcin H47 (Supp. Fig 4B) immunity genes.**

Colony forming unit (CFU) counts of *E. coli* LF82 carrying; A: a plasmid encoding microcin M (MccM) immunity gene *mcmI* (pMcMi); B: microcin H47 (MccH47) immunity gene *mchI* (pMcHi) after a 24-hour co-culture in M63 minimal medium with wild-type (WT) *E. coli* strain Nissle (EcN), EcN mutants for MccM precursor gene *mcmA*, for MccH47 precursor gene *mchB*, and for both *mcmA* *mchB* genes. LF82 carrying pMcMi or pMcHi were also cultured alone as controls (∅). The medians and individual results of independent experiments are shown. One-way ANOVA and Bonferroni post-tests in comparison with co-culture with WT; ★★★P<0.001.



**Figure S5. ClbP-dependent antagonist activity of strains carrying both a truncated microcin gene cluster and the *pks* island.**

Colony forming unit (CFU) counts of *E. coli* LF82 following a 24-hour co-culture in Dulbecco's Modified Eagle Medium with *E. coli* strains that carry both a truncated microcin gene cluster and the *pks* island: wild-type (WT) *E. coli* strains Nissle 1917 (Ecn), CFT073 (CFT), ABU83972 (ABU), ATCC<sup>®</sup>25922 (ATCC), the corresponding *clbP* gene deletion mutants and complemented mutant strains, and *pks*<sup>+</sup> *E. coli* strain M1/5 (human commensal), SP15 (responsible for meningitis), NC101 (murine commensal and procarcinogenic), MG1655 that hosts a bacterial artificial chromosome (BAC) bearing the *pks* island (MGbacpks), and the corresponding *clbP* gene deletion mutants. LF82 was also cultured alone as a control (∅). Medians and individual results of independent experiments are shown. One-way ANOVA and Bonferroni post-tests; \*\*\*P<0.001.

## References

1. 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 Nov 1;3(6):501–9.
2. Secher T, Kassem S, Benamar M, Bernard I, Boury M, Barreau F, et al. Oral administration of the probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917 reduces susceptibility to neuroinflammation and repairs experimental autoimmune encephalomyelitis-induced intestinal barrier dysfunction. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Sep 14;8.
3. Pérez-Berezo T, Pujo J, Martin P, Faouder P, Galano J-M, Guy A, et al. Identification of an analgesic lipopeptide produced by the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Nat Commun*. 2017 Nov 3;8(1):1314.
4. Boudeau J, Glasser A-L, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun*. 1999 Sep;67(9):4499–509.
5. 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 May 1;5(3):313–25.
6. Payros D, Dobrindt U, Martin P, Secher T, Bracarense APFL, Boury M, et al. The food contaminant deoxynivalenol exacerbates the genotoxicity of gut microbiota. *mBio*. 2017 May 3;8(2):e00007-17.
7. 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 Mar 15;185(6):774–84.
8. Patwa LG, Fan T-J, Tchaptchet S, Liu Y, Lussier YA, Sartor RB, et al. Chronic intestinal inflammation induces stress response genes in commensal *Escherichia coli*. *Gastroenterology*. 2011 Nov;141(5):1842-51.e1-10.
9. Kim SC, Tonkonogy SL, Albright CA, Tsang J, Balish EJ, Braun J, et al. Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. *Gastroenterology*. 2005 Apr;128(4):891–906.
10. Tomkovich S, Yang Y, Winglee K, Gauthier J, Mühlbauer M, Sun X, et al. Locoregional effects of microbiota in a preclinical model of colon carcinogenesis. *Cancer Res*. 2017 May 15;77(10):2620–32.
11. 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* [Internet]. 2013 Jul;9(7).

12. Mobley HL, Green DM, Trifillis AL, Johnson DE, Chippendale GR, Lockatell CV, et al. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect Immun*. 1990 May;58(5):1281–9.
13. Andersson P, Engberg I, Lidin-Janson G, Lincoln K, Hull R, Hull S, et al. Persistence of *Escherichia coli* bacteriuria is not determined by bacterial adherence. *Infect Immun*. 1991 Sep 1;59(9):2915–21.
14. Lindberg U, Hanson LA, Jodal U, Lidin-Janson G, Lincoln K, Olling S. Asymptomatic bacteriuria in schoolgirls. II. Differences in *Escherichia coli* causing asymptomatic bacteriuria. *Acta Paediatr Scand*. 1975 May;64(3):432–6.
15. Andersen PS, Stegger M, Aziz M, Contente-Cuomo T, Gibbons HS, Keim P, et al. Complete genome sequence of the epidemic and highly virulent CTX-M-15-producing H30-Rx subclone of *Escherichia coli* ST131. *Genome Announc* [Internet]. 2013 Dec 5;1(6).
16. Nash JH, Villegas A, Kropinski AM, Aguilar-Valenzuela R, Konczyk P, Mascarenhas M, et al. Genome sequence of adherent-invasive *Escherichia coli* and comparative genomic analysis with other *E. coli* pathotypes. *BMC Genomics*. 2010 Nov 25;11:667.
17. Deriu E, Liu JZ, Pezeshki M, Edwards RA, Ochoa RJ, Contreras H, et al. Probiotic bacteria reduce *Salmonella* Typhimurium intestinal colonization by competing for iron. *Cell Host Microbe*. 2013 Jul 17;14(1):26.
18. 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 Oct 14;286(41):35562–70.
19. Vassiliadis G, Destoumieux-Garzón D, Lombard C, Rebuffat S, Peduzzi J. Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M and H47. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jan;54(1):288–97.
20. 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 Aug 11;313(5788):848–51.

## **Article 2 : L'association synergique îlot sidérophores-microcines, îlot *pks* et locus *iroA*, un facteur de colonisation urinaire de *E. coli***

**The synergistic triad between microcin, colibactin, and salmochelin islands: a key colonization factor in uropathogenic *Escherichia coli***

Clémence Massip, Camille Chagneau, Michèle Boury, Eric Oswald

Au cours des travaux ayant conduit à l'**Article 1**, nous avons constaté parmi des souches de collection séquencées, que l'association îlot sidérophores-microcines tronqué- îlot *pks* - locus *iroA* était présente exclusivement dans des souches du phylogroupe B2, en majorité isolées d'urines. En parallèle, les souches portant un îlot microcines « non tronqué » étaient issues d'isolats fécaux et appartenaient à d'autres phylogroupes. L'objectif de cette étude était donc d'une part de déterminer sur une cohorte large si la triade îlot sidérophores-microcines tronqué- îlot *pks* - locus *iroA* se vérifiait (ou si elle pouvait être mise en défaut). D'autre part, nous souhaitons étudier sa prévalence au sein des UPEC et son association éventuelle avec d'autres facteurs de virulence ou la gravité de l'infection urinaire.

Avant de rapporter les principaux résultats de cette étude, une rapide synthèse bibliographique sera ici présentée au sujet des méthodes diagnostiques des infections urinaires et des principaux facteurs de virulence des souches UPEC. Notre étude se concentre sur l'étude de déterminants pouvant intervenir dans la physiopathologie des infections urinaires. C'est pourquoi, les infections nosocomiales ou survenant chez des patients porteurs de prédispositions urologiques seront exclues. Ces situations nécessitent des études spécifiques car elles ne relèvent pas de la seule relation hôte-pathogène.

### **Diagnostic des infections urinaires**

*E. coli* constitue la première cause d'infections urinaires qu'il s'agisse de pyélonéphrites (infections rénales), de cystites (infections vésicales) ou de bactériuries asymptomatiques. Ces infections génèrent une importante morbidité, représentent des dépenses importantes pour les systèmes de santé et favorisent l'émergence des

résistances bactériennes car elles sont une des premières causes de prescription d'antibiotiques en communautaire (167,168). Le diagnostic des infections urinaires repose sur des arguments cliniques et bactériologiques (169).

La cystite se traduit cliniquement par des signes fonctionnels urinaires (brûlures mictionnelles, pollakiurie, mictions impérieuses). En cas de pyélonéphrite, ces signes fonctionnels sont souvent discrets et l'atteinte rénale est caractérisée par une fièvre, des douleurs de la fosse lombaire, typiquement unilatérales, spontanées ou provoquées par la palpation. Des signes digestifs (diarrhées, vomissements) peuvent être présents, parfois au premier plan, ce qui complique le diagnostic (169). Les bactériuries asymptomatiques se définissent par la présence d'une concentration significative de bactéries dans l'urine sans symptôme évocateur d'une infection urinaire (169,170). Leur prévalence augmente avec l'âge. Ainsi, une bactériurie se retrouve chez moins de 5 % des femmes en bonne santé en pré-ménopause, mais elle est présente chez 20 % des femmes de plus de 80 ans et touche jusqu'à 50 % des femmes de la même classe d'âge résidant en établissement de soins de long séjour (170,171).

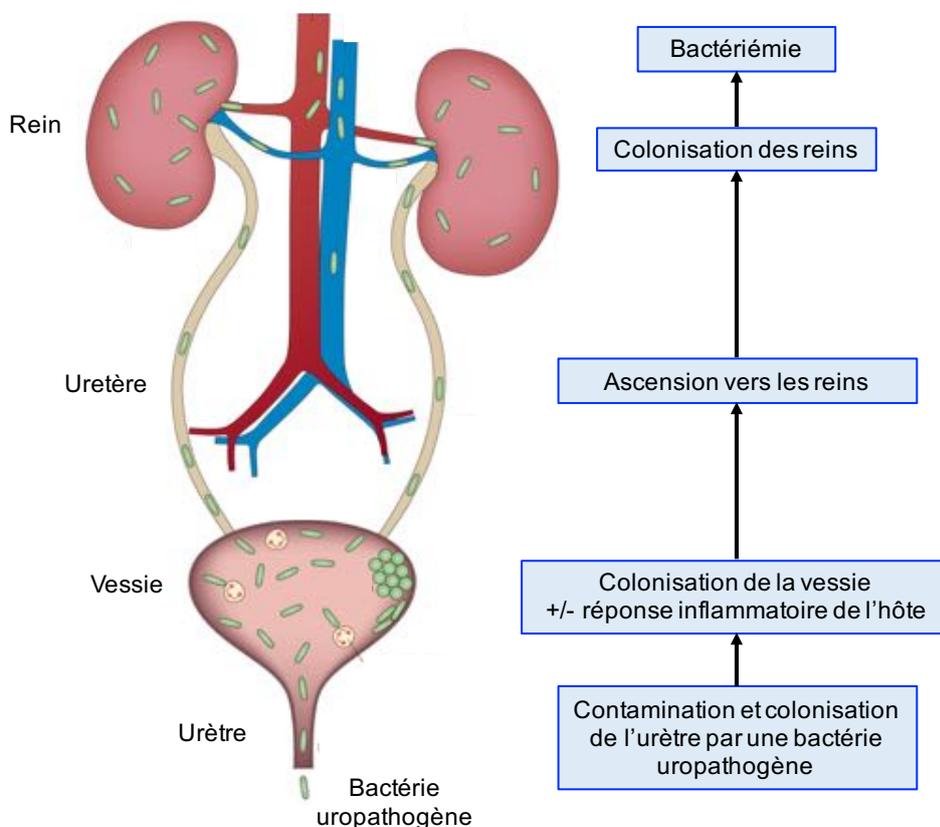
La distinction clinique entre infection urinaire symptomatique et asymptomatique est problématique chez le sujet âgé. Des symptômes en lien avec une pathologie chronique, des problèmes de communication, ou une confusion compliquent fréquemment l'auscultation et l'interrogatoire médical (171). Les signes fonctionnels urinaires sont souvent absents et remplacés par des signes non spécifiques : chute, malaise, décompensation d'une pathologie sous-jacente (169,171). La forte prévalence des bactériuries chez les personnes âgées associées à ces difficultés diagnostiques cliniques sont à l'origine d'une probable prescription inadaptée d'antibiotiques (171–173). Chez des patients fragilisés et souvent institutionnalisés, cette dernière génère des effets secondaires évitables et promeut l'émergence de bactéries multi-résistantes. Dès lors, des marqueurs prédictifs d'infections urinaires symptomatiques chez le sujet âgé sont recherchés (172), qu'il s'agisse de profils de virulence de la souche responsable de l'infection ou de marqueurs de la réponse immunologique de l'hôte (173).

Par ailleurs, le diagnostic microbiologique d'une infection urinaire repose sur la mise en évidence d'une leucocyturie révélatrice d'une inflammation des voies urinaires et d'une concentration significative de bactéries dans l'urine. Pour *E. coli*, la concentration est considérée comme significative au-delà de  $10^3$  unités formant

colonies (UFC) / mL en cas de leucocyturie. Elle est portée à  $10^5$  UFC / mL en l'absence de leucocyturie (169). En cas de cystite aiguë simple, seule la réalisation d'une bandelette urinaire est recommandée. Elle permet de détecter une leucocyturie et la présence de bactéries produisant une nitrate réductase, telles que *E. coli*. Cette dernière étant à l'origine de 70 à 95 % des infections urinaires communautaires, la valeur prédictive négative de la bandelette urinaire est supérieure à 95 % en cas de suspicion de cystite aiguë simple (169).

## Facteurs de virulence des UPEC

Une infection urinaire débute par la contamination de la région périnéale par une souche en provenance du réservoir digestif. Cette bactérie colonise l'urètre puis peut migrer vers la vessie (**Figure 27**), où elle peut provoquer une réponse inflammatoire et les symptômes de cystite. L'ascension vers les reins *via* les uretères et leur colonisation conduisent à une pyélonéphrite. Une dissémination sanguine est alors possible (167,168).



**Figure 27 : Physiopathologie des infections urinaires**

Modifié d'après Flores-Mireles A. *et al.* (167)

De nombreuses équipes se sont intéressées à l'étude des facteurs de virulence des UPEC pour tenter d'expliquer notamment leurs capacités de colonisation et de persistance au système immunitaire de l'hôte. Les souches UPEC appartiennent majoritairement au phylogroupe B2, et dans une moindre mesure D et F (174–177). Elles se caractérisent généralement par la possession de nombreux facteurs de virulence souvent portés par des îlots génomiques (175,177,178). Nous ne nous intéresserons ici qu'aux quelques déterminants retenus pour notre étude.

L'urine est un milieu particulièrement pauvre en fer. Les quatre types de sidérophores évoqués au paragraphe III. 4. de la synthèse bibliographique consacrée à *E. coli* Nissle, entérobactine, salmochélines, aérobactine et yersinibactine sont ainsi particulièrement retrouvés chez les UPEC. Ils sont essentiels à la croissance des UPEC dans l'urine (179) et leur synthèse est d'ailleurs augmentée dans ce milieu (180,181).

La yersiniabactine est un des facteurs de virulence les plus fréquemment retrouvés chez les UPEC quelle que soit la gravité clinique (174). Dans un modèle murin, une souche UPEC mutée pour le récepteur de la yersinibactine FyuA a une capacité de colonisation vésicale et rénale réduite (alors que sa croissance *in vitro* n'est pas altérée). Ce récepteur a ainsi été proposé comme cible vaccinale pour prévenir les pyélonéphrites et urosepsis liés aux UPEC (181).

L'aérobactine et l'entérobactine contribuent le plus à l'activité sidérophore dans des milieux carencés en fer (179). Mais l'aérobactine a un rôle prédominant à pH 5,5 (179), ce qui est en accord avec la plus grande stabilité de l'association aérobactine-Fe<sup>3+</sup> dans des environnements acides (80). Une étude transcriptomique de CFT073 a révélé que deux gènes du système de production / recapture de l'aérobactine (*iucD* et *iutA*) sont particulièrement surexprimés lorsque la souche est cultivée dans l'urine humaine (182). Ceci contribue à expliquer qu'une proportion plus importante de souches productrices d'aérobactine ait déjà été observée parmi les souches responsables de pyélonéphrites par rapport aux souches fécales ou responsables de cystites (180,183,184).

Les fimbriae P et les adhésines Pap portées à leurs extrémités permettent d'adhérer à l'épithélium de l'arbre urinaire et rénal. L'allèle PapGII est significativement associé aux pyélonéphrites dans des études consacrées aux facteurs de virulence des

UPEC en fonction de la gravité clinique (174,184). L'utilisation d'une souche produisant des fimbriae P dépourvus de l'adhésine PapGII dans un modèle murin a prouvé que PapGII est déterminant pour la colonisation et l'établissement de l'infection rénale (185).

Trois types de toxines sont particulièrement décrits chez les souches UPEC: l'hémolysine  $\alpha$ , CNF-1 (cytotoxic necrotizing factor 1) et Sat (secreted autotransporter toxin) (168). L'hémolysine  $\alpha$  codée par l'opéron *hlyCABD* est cytotoxique non seulement pour les érythrocytes comme son nom l'indique, mais aussi pour de nombreuses cellules nucléées comme les leucocytes, les fibroblastes ou les cellules uro-épithéliales (168). La lyse cellulaire qu'elle provoque entraîne la libération de nutriments, dont le fer, qui peuvent être captés par la bactérie uropathogène (167,168). Les souches UPEC portent plus fréquemment les gènes codant l'hémolysine  $\alpha$  que les souches fécales, mais la prévalence semble similaire entre les souches responsables de cystites ou de pyélonéphrites (174,180,184).

La toxine CNF-1 est fréquemment produite par les UPEC. L'association avec l'hémolysine  $\alpha$  est quasiment systématique car elles sont génétiquement liées (168). Elle permet une internalisation accrue des UPEC par les cellules uro-épithéliales et prévient ensuite l'apoptose de ces cellules. Elle favorise ainsi la formation d'une niche intracellulaire dans laquelle les bactéries peuvent se multiplier (167). L'action coordonnée de l'hémolysine  $\alpha$  qui déclenche l'exfoliation des cellules de l'épithélium permet ensuite la dissémination des colonies intracellulaires d'UPEC (167).

La toxine Sat, plus souvent produite par des souches UPEC que des souches fécales exerce un effet cytopathique sur les cellules épithéliales vésicales et rénales humaines (186). La prévalence des UPEC produisant cette toxine en fonction de la gravité clinique (cystite ou pyélonéphrite) est variable en fonction des études (180,183).

## Synthèse de notre étude

Plus de 200 souches de *E. coli* ont été recueillies à la suite d'examens cyto-bactériologiques des urines pratiqués sur des patients adultes dans le cadre de leur prise en charge aux urgences du CHU de Toulouse. Pour chaque patient, les informations cliniques (diagnostic retenu, facteurs d'exclusion) ont été recherchées dans le compte rendu d'hospitalisation. En parallèle nous avons recherché par PCR divers facteurs de virulence classiquement décrits chez les souches UPEC (*hlyA*, *papGII*, *sat*, *cnf1*), des gènes codant les sidérophores (salmochélines, aérobactine et yersiniabactine), les gènes responsables de la synthèse des précurseurs des microcines H47 et M, ainsi que les gènes *mcmL* et *mcmK*. Les phylogroupes de l'ensemble des souches ont aussi été déterminés.

La plupart des souches de notre étude (environ 70 %) appartiennent au phylogroupe B2. De plus, conformément aux données de la littérature, les souches responsables de pyélonéphrites sont davantage porteuses de l'allèle *PapGII* et du gène *iutA* impliqué dans la recapture de l'aérobactine que les souches responsables de cystites ou de bactériuries asymptomatiques. A l'inverse, le gène *cnf1* est moins présent parmi les souches responsables de pyélonéphrites.

Par ailleurs, nous avons pu confirmer l'association systématique des trois systèmes : îlot sidérophores-microcines tronqué, îlot *pks* et locus *iroA*. Elle se retrouve chez 24 % des souches (54 / 225) mais sa prévalence n'augmente pas avec la sévérité clinique, ce qui indique qu'elle pourrait jouer un rôle dans la colonisation de l'arbre urinaire plutôt que dans la virulence *stricto sensu*. Cependant, les souches porteuses de cette triple association possèdent davantage d'autres facteurs de virulence (*hly*, *sat*, *cnf*, *fyuA*, *iutA*, *papGII*) que les souches qui en sont dépourvues.

## **The synergistic triad between microcin, colibactin, and salmochelin islands: a key colonization factor in uropathogenic *Escherichia coli***

Clémence Massip<sup>1,2</sup>, Camille Chagneau<sup>1</sup>, Michèle Boury<sup>1</sup>, Eric Oswald<sup>1,2</sup>

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

2, CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service de Bactériologie-Hygiène, Toulouse, France

### **Objectives**

*E. coli* is also the most common cause of urinary tract infections (UTI). Two hypotheses have long been opposed to explain the pathophysiology of UTI: the strain that causes UTI is simply the most abundant strain in the faecal *E. coli* population (prevalence hypothesis) or it represents a selected subset with enhanced virulence potential (special pathogenicity hypothesis).

Uropathogenic *E. coli* (UPEC) mainly belong to phylogroup B2 (1–3). B2 phylogroup strains contain more virulence factors and pathogenicity islands than strains from other phylogroups (3). In particular, they can often synthesize microcins H47 and M. Bacteria producing such antimicrobial peptides display a bactericidal activity against phylogenetically related bacteria, which gives them a strong selective advantage in the competitive intestinal niche (4). Model strains of UPEC from the B2 phylogroup, such as CFT073, ATCC25922 or ABU83972 carry a truncated microcin H47 and M gene cluster, deprived of two genes *mcmL* and *mcmK* involved in posttranslational modifications. In such strains, microcins production requires the glucosylesterase IroB from the *iroA* locus and the peptidase ClbP from the *pks* island.

In this study, we established the prevalence of microcins H47 and M determinants, the *pks* island, and the *iroA* locus in a large set of *E. coli* isolates responsible of UTIs. The objective was to determine if the synergistic association between these virulence factors was common in UPEC, and if it was correlated with the clinical severity of the UTI.

## Methods

Two hundred and twenty-five *E. coli* strains were isolated from urinary samples between July and October 2017. These samples were collected from men and women hospitalized in the Adult Emergency Department of Toulouse University Hospital, France. Clinical data of patients were retrospectively collected from the hospital's computerized medical records (Urqual software, Maincare Solutions, France). According to French regulation on observational database analyses, the study did not need specific informed consent requirements.

*E. coli* strains were classified into 3 groups according to the clinical diagnosis: 104 pyelonephritis, 84 cystitis, and 37 asymptomatic bacteriuria causing strains. Patients having urological comorbidities had been excluded, as well as those catheterised or with diagnosis which could lead to misclassification (e.g. renal colic). As the diagnosis and stratification of UTI are more complicated in the elderly (5,6), subjects aged over 75 were excluded.

All strains were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Microflex LT MALDI-TOF MS, Bruker Daltonik GmbH, Germany). Their phylogenetic group was determined using the extended quadruplex PCR protocol described previously (7). Using two multiplex panels (8), the presence of three siderophore systems (salmochelins, aerobactin, and yersiniabactin), and four virulence factors was screened in all isolates: hemolysin  $\alpha$ , cytotoxic necrotizing factor 1 (*cnf1*), secreted auto transporter toxin (*sat*), and allele II of adhesin gene *papG*. Detection of the *pks* island was performed as previously described (9). Genes *mchB* and *mcmA* encoding microcins H47 and M precursor proteins were searched, as well as genes *mcmL/mchA* and *mcmK/mchS1* involved in their posttranslational modifications (10). The PCR primers and conditions are described in Supplementary data.

Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 7.0a (GraphPad, San Diego, CA, USA). *P* values were calculated using two-sided Fischer's exact test. *P* values < 0.05 were considered significant.

## Results

*E. coli* strains mostly belonged to B2 phylogroup (155/225, *i.e.* 69%) and to a far lesser extent to D phylogroup (31/225, *i.e.* 14%), in line with previous reports (1,6,11) (Fig. 1). There was no statistical difference in the percentages of B2 phylogroup strains between the ABU, cystitis and pyelonephritis groups (Fig. 2). The distribution of virulence factors according to clinical severity fitted in with previous reports (Fig. 2). The allele II of *papG* and aerobactin were more prevalent in the pyelonephritis than in the cystitis group (1,11–13). Conversely, haemolysin  $\alpha$  and *cnf1* were less found in strains responsible for pyelonephritis compared to cystitis causing strains (Fig. 2). Although, they are classically described as virulence factors in *E. coli* strains causing UTI, the lack of correlation between clinical severity and the presence or expression of the genes encoding these toxins had previously been reported (1,12). Yersiniabactin, described as a key virulence factor in UPEC (14), was the most commonly detected siderophore in our study with 202/225 (90%) of positive strains.

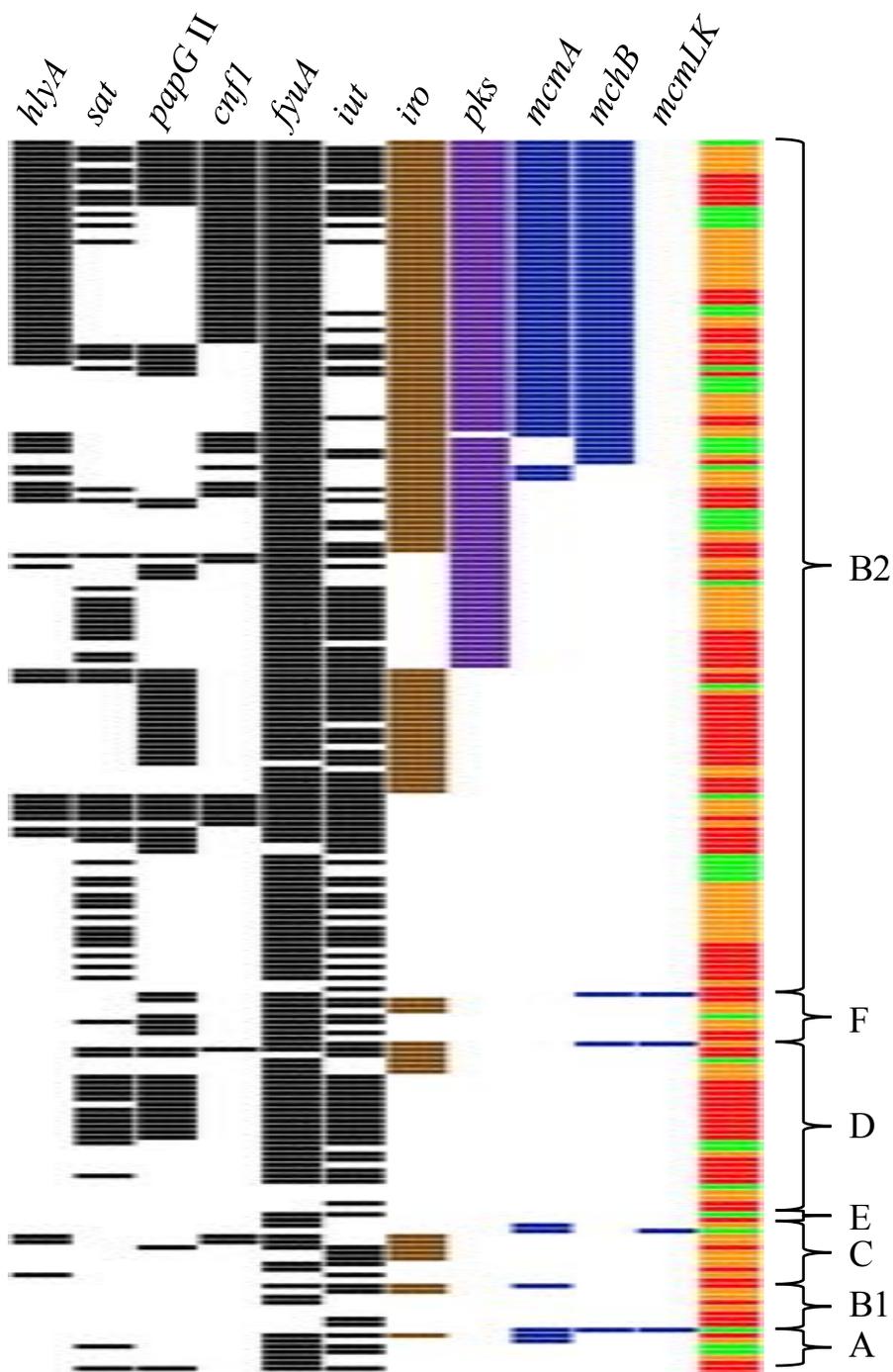
Genes encoding microcins H47 or M precursors were detected in 31% of strains (70/225). Strains carrying these microcins genes were significantly more numerous among B2 phylogroup strains than among non-B2 strains (62/155 vs 8/70;  $P=0.00001$ ) (Fig. 1). Out of the 63 strains that harboured the microcin M gene, 55 strains (87%) also carried microcin H47 precursor gene. The strong association between microcins H47 and M had previously been reported in smaller collections of UPEC (2,15). It suggests that, in UPEC, genes encoding microcins M and H47 are located on the same gene cluster, like in the model UPEC strains CFT073, ATCC25922, and ABU83972 (16).

Strikingly, all B2 phylogroup strains that carried one of the two microcin precursor genes also harboured the *pks* island and the *iroA* locus (Fig. 1). Conversely, none of these strains carried the *mcmL*, *mcmK* genes. These homologs to genes encoding enterobactin glucosylase *iroB* and esterase *iroD* were only found in non-B2 phylogroup strains which were deprived of the *pks* island and *iroA* locus. B2 strains that harbour this triple combination (microcin precursor genes, *pks* island, and *iroA* locus) carried significantly more virulence factors (independent of these three determinants) than other UPEC ( $P<0.0001$  using a Mann-Whitney test).

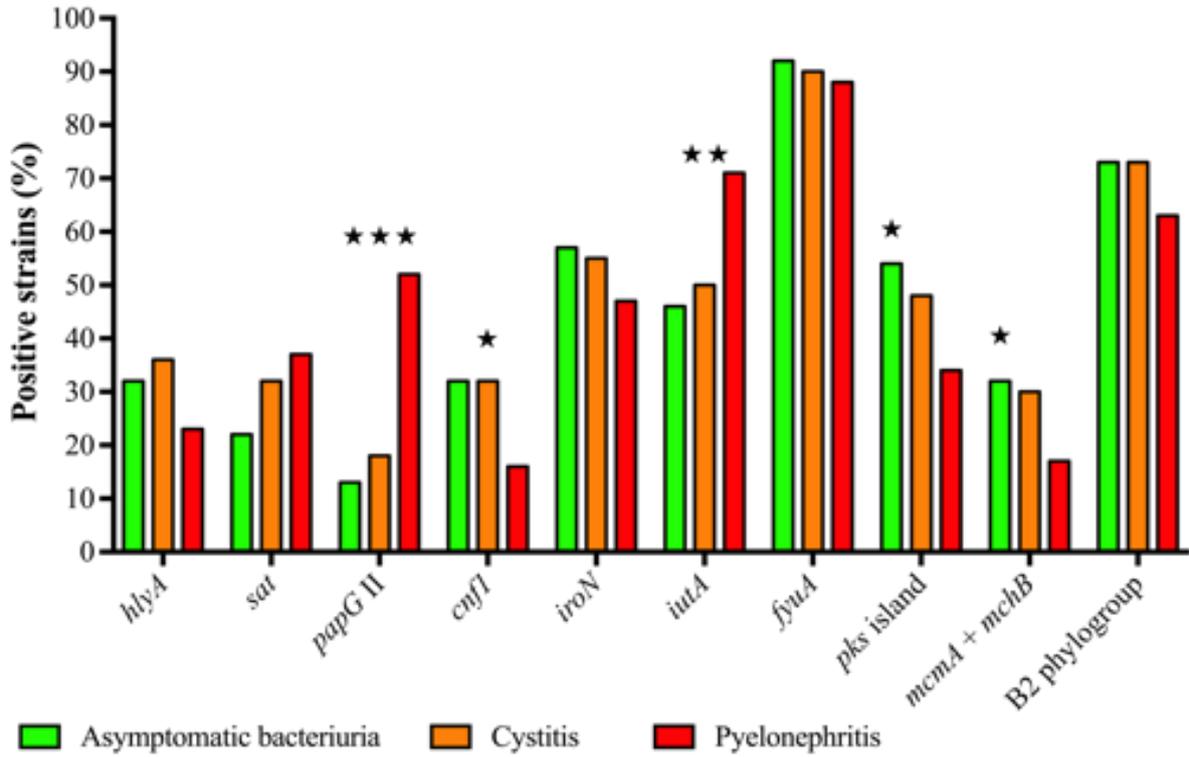
## Discussion

We proved in a recent study that in strains carrying a truncated microcin gene cluster (deprived of *mcmL* and *mcmK*), microcin production required ClbP encoded by the *pks* island and IroB from the *iroA* locus. The mutual exclusion between the *iroA* locus and the *iroB/iroD* homologs *mcmL/mcmK* had previously been noticed in a study with a collection of 18 microcin-producing UPEC, but the *pks* island had not been searched for (15). Our study demonstrated the high prevalence of this synergistic triad in UPEC, which suggests that it might be a selective advantage. However, the *pks* island and genes encoding precursors of microcins H47 and M were more frequently found in ABU than in pyelonephritis-causing strains (Fig. 2). With a smaller collection of cystitis and pyelonephritis-causing strains, Abraham *et al*, had observed no significant difference in the prevalence of genes encoding microcins H47 and M between ABU and symptomatic UTI strains (2). Therefore, these microcins do not appear as *bona fide* virulence factors within the urinary tract.

In a study that compared the whole genome sequences of UTI isolates to faecal isolates from the same patients, microcin M precursor gene was significantly over-represented in UTI isolates (17). Therefore, we hypothesize that the association between a truncated microcin gene cluster, the *pks* island, and the *iroA* locus would promote urinary tract colonization. It enables the production of at least three colonization determinants (microcins, colibactin, and salmochelins) (18,19) with a limited impact on genome size. This domination of the rectal niche, which is the reservoir to infect the urinary tract (20), with a minimal genetic cost might also favour the selection of other virulence factors. Hence, the synergistic triad between a truncated microcin gene cluster, the *pks* island, and the *iroA* locus could be the element that reconciliates the prevalence and the special-pathogenicity hypotheses.



**Fig. 1.** Schematic representation of the virulence profile of each of the 225 *E. coli* strains. Each rectangle represents the presence of a virulence gene (black for *hlyA*, *sat*, *papG II*, *cnf1*, *fyuA*, and *iut*, brown for *iro*, purple for the *pks* island, and blue for genes related to microcins H47 and M production). Green, orange, and red rectangles represent strains causing asymptomatic bacteriuria, cystitis, and pyelonephritis, respectively. Each alignment of rectangles corresponds to one of the 226 strains. The strains were classified by phylogroups and, within phylogroups strains carrying genes encoding microcins precursors *mcmA* or *mchB* were grouped.



**Fig. 2.** Prevalence of virulence determinants according to clinical severity. The statistical differences between either the asymptomatic bacteriuria or the cystitis group and the pyelonephritis group is denoted  $\star$  for  $P$  values  $< 0.05$ ,  $\star\star$  for  $P < 0.01$ , and  $\star\star\star$  for  $P < 0.001$ .

## References

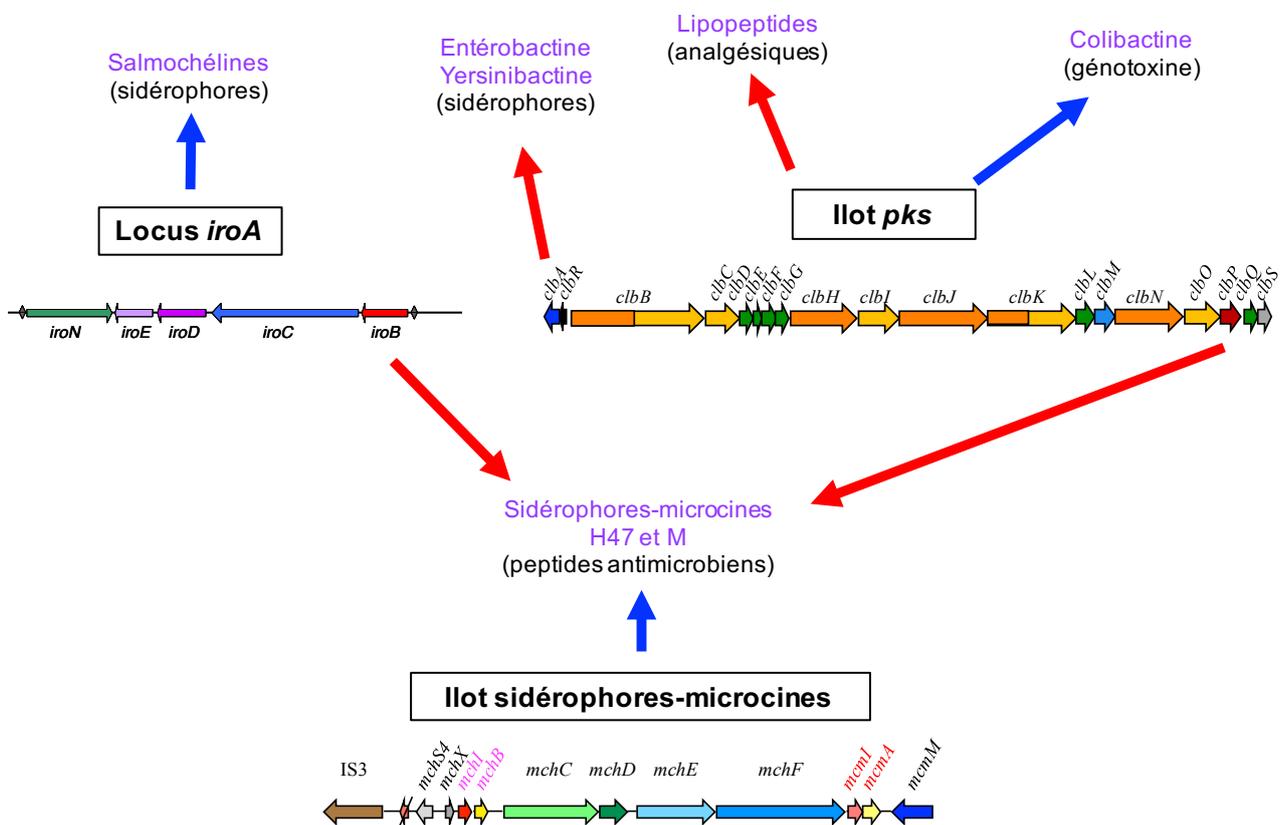
1. Johnson JR, Owens K, Gajewski A, Kuskowski MA. Bacterial characteristics in relation to clinical source of *Escherichia coli* isolates from women with acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women. *J Clin Microbiol*. 2005 Dec;43(12):6064–72.
2. Abraham S, Chapman TA, Zhang R, Chin J, Mabbett AN, Totsika M, et al. Molecular characterization of *Escherichia coli* strains that cause symptomatic and asymptomatic urinary tract infections. *J Clin Microbiol*. 2012 Mar;50(3):1027.
3. Tourret J, Denamur E. Population phylogenomics of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*. 2016 Jan 7;4(1).
4. Duquesne S, Destoumieux-Garzón D, Peduzzi J, Rebuffat S. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat Prod Rep*. 2007 Jul 25;24(4):708–34.
5. Nicolle LE. Urinary infections in the elderly: symptomatic or asymptomatic? *Int J Antimicrob Agents*. 1999 May 1;11(3):265–8.
6. Amarsy R, Guéret D, Benmansour H, Flicoteaux R, Berçot B, Meunier F, et al. Determination of *Escherichia coli* phylogroups in elderly patients with urinary tract infection or asymptomatic bacteriuria. *Clin Microbiol Infect*. 2019 Jan 12;
7. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environ Microbiol Rep*. 2013 Feb 1;5(1):58–65.
8. Johnson JR, Porter S, Johnston B, Kuskowski MA, Spurbeck RR, Mobley HLT, et al. Host characteristics and bacterial traits predict experimental virulence for *Escherichia coli* bloodstream isolates from patients with urosepsis. *Open Forum Infect Dis*. 2015 Jun 6;2(3).
9. 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 Aug 11;313(5788):848–51.
10. Vassiliadis G, Peduzzi J, Zirah S, Thomas X, Rebuffat S, Destoumieux-Garzón D. Insight into siderophore-carrying peptide biosynthesis: enterobactin is a precursor for microcin E492 posttranslational modification. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Oct;51(10):3546–53.
11. Johnson JR, Kuskowski MA, Gajewski A, Soto S, Horcajada JP, Anta D, et al. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J Infect Dis*. 2005 Jan 1;191(1):46–50.
12. Mobley HLT. Measuring *Escherichia coli* gene expression during human urinary tract infections. *Pathogens*. 2016 Jan 15;5(1).
13. Ruiz J, Simon K, Horcajada JP, Velasco M, Barranco M, Roig G, et al. Differences in virulence factors among clinical isolates of *Escherichia coli* causing cystitis and pyelonephritis in women and prostatitis in men. *J Clin Microbiol*. 2002 Dec;40(12):4445–9.

14. 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 Apr 1;83(4):1443–50.
15. Azpiroz MF, Poey ME, Laviña M. Microcins and urovirulence in *Escherichia coli*. *Microb Pathog*. 2009 Nov;47(5):274–80.
16. Azpiroz MF, Bascuas T, Laviña M. Microcin H47 system: an *Escherichia coli* small genomic island with novel features. *PLoS ONE*. 2011 Oct 11;6(10).
17. Nielsen KL, Stegger M, Kiil K, Godfrey PA, Feldgarden M, Lilje B, et al. Whole-genome comparison of urinary pathogenic *Escherichia coli* and faecal isolates of UTI patients and healthy controls. *Int J Med Microbiol*. 2017 Sep 14;
18. Fischbach MA, Lin H, Liu DR, Walsh CT. *In vitro* characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jan 18;102(3):571.
19. 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 Oct 14;286(41):35562–70.
20. Yamamoto S, Tsukamoto T, Terai A, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Genetic evidence supporting the fecal-perineal-urethral hypothesis in cystitis caused by *Escherichia coli*. *J Urol*. 1997 Mar;157(3):1127–9.

# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

## La triade îlot microcines tronqué - îlot *pks* - locus *iroA*, un facteur de polyvalence des souches du phylogroupe B2

Nous avons démontré dans la souche *E. coli* Nissle, et plus largement dans les souches du phylogroupe B2, une synergie fonctionnelle entre l'îlot sidérophores-microcines, l'îlot *pks* et le locus *iroA* (**Article 1**). Ainsi, grâce à ces trois îlots, au moins six facteurs de virulence peuvent être produits : les sidérophores entérobactine, salmochélines et yersiniabactine (162), la colibactine (11), des lipopeptides aux propriétés analgésiques (163) et les sidérophores-microcines H47 et M (Figure 28).



**Figure 28** : Facteurs de virulence produits par les îlots *pks*, *iroA* et sidérophores-microcines

Flèches bleues : production initialement décrite, mettant en jeu tous les gènes de l'îlot  
 Flèches rouges : rôles additionnels, faisant intervenir un ou quelques gènes de l'îlot uniquement

Cette polyvalence des îlots génomiques permet une « économie du génome ». La triple association que nous avons décrite renferme ainsi trois protéines pléiotropes : IroB, ClbA et ClbP sont impliquées dans plusieurs processus de biosynthèse distincts. IroB intervient dans les synthèses des salmochélines (166) et des sidérophores-microcines et ClbA dans les synthèses de la colibactine, des sidérophores et des lipopeptides analgésiques (162,163). Si les produits générés sont différents, chacune de ces deux protéines exerce cependant une seule activité : IroB exerce une activité glucosyltransférase quelle que soit la chaîne de biosynthèse et ClbA une activité PPTase. ClbP représente à ce titre un cas particulier : l'activité peptidase de son domaine périsplasmique intervient spécifiquement dans la synthèse de la colibactine, alors que son domaine transmembranaire seul joue un rôle dans la synthèse des sidérophores-microcines.

Si le pan-génome de *E. coli*, c'est à dire la somme des gènes présents dans toutes les souches de l'espèce, représente plus de 17 000 gènes, une seule souche de *E. coli* ne peut en moyenne héberger que 4 700 gènes (5,187). La polyvalence des îlots génomiques et donc l'économie de « moyens génétiques » sont donc indispensables pour que les souches du phylogroupe B2, *a fortiori* les ExPEC, puissent produire leurs nombreux facteurs de virulence.

La colibactine et les lipopeptides analgésiques sont destinés à la maîtrise de l'hôte, bien que le rôle précis de la colibactine pour la bactérie reste encore inconnu. Les différents sidérophores et les microcines permettent une compétition efficace avec d'autres bactéries d'une niche donnée. Ils interviennent respectivement dans la compétition par concurrence et la compétition par interférence (188). De par la diversité des sidérophores qu'elle produit, une bactérie porteuse de la triple association est un concurrent particulièrement efficace pour capter le fer, élément nutritionnel présent en quantité limitée. Par ailleurs, elle produit des molécules antibiotiques vis-à-vis de bactéries compétitrices pour l'occupation de la niche. Grâce à la synergie entre ces trois îlots génomiques, la bactérie peut ainsi dominer une niche écologique donnée et s'adapter à des environnements divers.

Pour diffuser et exercer un pouvoir pathogène dans l'ensemble de l'organisme, les ExPEC doivent s'adapter à des environnements très variés. Le liquide céphalo-rachidien infecté par une souche responsable de méningites est *a priori* très différent de l'urine colonisée par une souche UPEC. De prime abord, chaque type

d'ExPEC pourrait donc apparaître comme spécialisé dans un type d'infection et avoir acquis sélectivement les facteurs de virulence adéquats. Cependant, ainsi que l'ont résumé Johnson J. et Russo T., les ExPEC sont des « généralistes » plutôt que des « spécialistes » (83). Outre quelques déterminants spécifiques, par exemple la prédominance des souches encapsulées K1 responsables de méningites, les facteurs de virulence se partagent entre toutes les catégories d'ExPEC car les contraintes auxquelles doivent faire face ces souches sont similaires : persistance et émergence depuis la niche intestinale polymicrobienne, adaptation à un environnement pauvre en nutriments et résistance au système immunitaire de l'hôte.

A l'inverse, les souches strictement commensales se sont spécifiquement adaptées à ce milieu. Pour reprendre l'exemple des sidérophores-microcines, Poey ME. *et al.* avaient déjà observé que les souches possédant le locus *iroA* possédaient un îlot microcines tronqué, dépourvu de *mcmL* et *mcmK* et inversement, que les souches possédant un îlot microcines « complet » ne portaient pas *iroA* (94). Il avait été proposé que l'intégration des gènes de glucosyltransférase et d'estérase de l'entérobactine dans l'îlot microcines soit un reflet de la spécialisation dans la production de microcines, ces gènes étant alors dévoués à la seule production de microcines. Cette observation avait également été faite dans une collection de 18 souches urinaires productrices de sidérophores-microcines. L'intégration des homologues de *iroB* et *iroD* dans l'îlot microcines avait même été décrite comme un « désavantage » potentiel du fait de la perte de polyvalence de la souche (189).

Si l'association îlot sidérophores-microcines « tronqué » et locus *iroA* avait déjà été remarquée parmi des souches UPEC (189), la cooccurrence et le rôle de l'îlot *pks* n'avaient jamais été mis en évidence. Par ailleurs, seule une étude avait tenté de corrélérer la présence des gènes codant les précurseurs des microcines avec la gravité clinique des infections urinaires (176). Elle ne comprenait que 44 souches issues d'infections symptomatiques (25 pyélonéphrites et 19 cystites). De même que dans notre étude, la répartition des souches productrices des microcines H47 et M était similaire dans les catégories cliniques (bactériuries asymptomatiques, cystites ou pyélonéphrites). L'association des îlots sidérophores-microcines, *pks* et *iroA* ne semble donc pas être un facteur de virulence dans le tractus urinaire.

Deux analyses transcriptomiques ont étudié les gènes dont la transcription était augmentée quand les souches UPEC étaient cultivées en urine humaine. La première,

utilisant CFT073 indique que les gènes *mchB* et *iroB* figurent parmi les 50 gènes dont la surexpression est la plus importante (182). La seconde étude concernant les souches CFT073, ABU83972 et Nissle montre que l'expression des trois systèmes îlots *pks*, sidérophores-microcines et locus *iroA* est induite quand les souches sont cultivées dans l'urine (18). Les microcines H47 et M semblent donc être des déterminants importants pour la colonisation urinaire, et ce d'autant plus que ce sont les bactériocines les plus fréquemment retrouvées parmi les souches UPEC (176,190). Une étude de Nielsen *et al.* confirme ce rôle des microcines H47 et M dans la colonisation du tractus urinaire. Les génomes complets de souches issues de prélèvements urinaires de patients présentant une infection ont été comparés aux génomes des souches fécales (différentes de la souche urinaire) isolées des mêmes patients (191). Le gène *mcmA* codant le précurseur de la microcine M était significativement associé aux souches responsables d'infections urinaires par rapport aux souches strictement fécales, ce qui n'était pas le cas pour les gènes responsables de la production des fimbriae pourtant classiquement décrits comme facteurs de virulence des UPEC.

L'association des îlots sidérophores-microcines, *pks* et *iroA* permettrait donc aux souches UPEC de dominer et d'émerger de la flore rectale tout en acquérant sélectivement d'autres facteurs de virulence. Les souches porteuses de cette triple association possèdent en effet davantage d'autres facteurs de virulence (hémolysine, CNF-1 par exemple), ce qui avait déjà été observé pour les UPEC productrices de microcines H47 et M (176). Ceci coïncide avec la physiopathologie communément admise des infections urinaires, mais étayée par peu d'études (192,193) : grâce à un panel de facteurs de virulence, une souche (généralement B2) devient prédominante dans la flore rectale et peut potentiellement contaminer l'urètre (193). Une fois dans le tractus urinaire, milieu particulièrement pauvre en fer, les différents sidérophores, dont les salmochélines permettent à la souche de survivre. Enfin, l'îlot *pks*, par la production de lipopeptides analgésiques pourrait contribuer à la maîtrise de l'hôte. Les UPEC constituent ainsi un exemple de la polyvalence que confère l'association des îlots sidérophores-microcines, *pks* et *iroA* aux souches du phylogroupe B2.

## Microcines et souches probiotiques : des alternatives aux traitements antibiotiques classiques ?

Ce travail a permis non seulement de progresser dans la compréhension de la physiopathologie des infections, en particulier urinaires, causées par *E. coli*, mais également de prendre part au courant de recherches actuelles sur de nouvelles pistes thérapeutiques dans la lutte contre les infections bactériennes.

En 2018, l'Organisation Mondiale de la Santé a décrété que le développement de nouveaux antibiotiques contre les bactéries à Gram négatif était une priorité absolue (44). La principale difficulté est de concevoir des composés capables de traverser la paroi particulièrement imperméable des bactéries à Gram négatif. Ces molécules devront également échapper, au moins partiellement, aux nombreuses pompes à efflux à large spectre produites constitutivement pour évacuer les composés potentiellement toxiques hors de la bactérie (194).

Une des stratégies consiste à utiliser comme porte d'entrée les transporteurs permettant aux bactéries d'internaliser des composés rares dans l'environnement et indispensables à leur survie comme le fer. Des antibiotiques ont donc été couplés à des sidérophores, ce qui correspond à une interprétation synthétique de la stratégie « Cheval de Troie » des sidérophores-microcines (188,195). Le premier antibiotique couplé à un sidérophore est le céfidérocol, actuellement en phase de recherche clinique. Récemment, cette céphalosporine couplée à un sidérophore de type catéchol a été montrée comme non inférieure à l'imipénème contre les infections urinaires compliquées dues aux bactéries uropathogènes à Gram négatif (entérobactéries principalement, mais aussi *Pseudomonas aeruginosa*) (196).

L'objectif du céfidérocol est donc d'exercer une activité antibiotique à large spectre et de se substituer aux carbapénèmes, famille d'antibiotiques de « dernier recours », dont l'efficacité est désormais menacée par l'émergence des résistances (44,197). Un autre axe de développement de nouveaux antibiotiques serait, à l'inverse, de produire des molécules à spectre étroit pour limiter l'émergence des résistances et les altérations de flores commensales. Les antibiotiques ont en effet été incriminés comme facteur déclenchant de pathologies aussi diverses que les diarrhées à *Clostridium difficile* ou les mycoses vaginales. Si le rôle du microbiote intestinal est

maintenant établi dans la survenue de nombreuses pathologies chroniques comme le diabète, les allergies, l'obésité ou les MICI, l'impact de la prise d'antibiotiques sur de telles affections reste largement méconnu (43). A ce titre, les microcines semblent particulièrement prometteuses, car leur spectre est limité aux entérobactéries avec des concentrations minimales inhibitrices très faibles de l'ordre du nanomolaire (88). Par ailleurs, elles n'ont *a priori* pas d'effet sur les cellules eucaryotes, ce qui limite le risque de survenue d'effet indésirables (198).

Pour que les microcines puissent être utilisées en applications cliniques, la question de l'émergence de résistances potentielles devra être investiguée. Comme l'usage extensif de ces molécules n'a pour l'heure pas été envisagé, ce problème potentiel n'a pas fait l'objet d'études dédiées. Des mécanismes de résistance aux microcines ont néanmoins déjà été mis en évidence, en particulier par l'acquisition de mutations dans les cibles des microcines. La survenue de mutations dans les gènes codant les sous-unités  $\beta$  ou  $\beta'$  de l'ARN polymérase confère une résistance à la microcine J25 (199). De même, des résistances à la microcine B17 apparaissent suite à des mutations du gène du *gyrB* codant l'ADN gyrase (200). Une résistance à la microcine J25 peut également survenir par surexpression de la pompe à efflux YojI de type ABC (201). Aucun mécanisme de résistance acquis spontané n'a jamais été décrit pour les sidérophores-microcines, mais cela n'a jamais fait l'objet d'études. Au final, les différentes microcines ayant des modes d'entrée, des structures, des cibles et des mécanismes d'action différents, il conviendrait d'en associer plusieurs en vue d'une application thérapeutique éventuelle pour éviter l'émergence rapide de résistances.

Une autre difficulté à surmonter pour une utilisation thérapeutique des microcines est leur dégradation dans le tractus gastro-intestinal si elles sont administrées par voie orale (202). C'est pourquoi, des souches probiotiques comme *E. coli* Nissle peuvent être modifiées pour produire d'autres microcines que les sidérophores-microcines H47 et M et servir ainsi de vecteurs. Dans le paragraphe II. 3. de la synthèse bibliographique consacrée à *E. coli* Nissle, nous avons ainsi évoqué quelques applications possibles de ce probiotique comme solution alternative aux antibiotiques.

La souche ABU83972 génétiquement proche de Nissle (82) a aussi été étudiée comme option thérapeutique dans la prévention des infections urinaires récurrentes.

Son efficacité a été démontrée dans une étude *versus* placebo chez 20 patients avec un historique d'infections urinaires récurrentes liées à des anomalies de l'arbre urinaire. Les patients ayant reçu des instillations vésicales de ABU83972 ont présenté significativement moins d'épisodes d'infections urinaires dans les 12 mois suivants que les patients ayant reçu un placebo, sans effet indésirable notable (203). En dépit de ces résultats encourageants, l'administration de ABU83972 en instillation vésicale n'est pas envisageable sur une plus large population de patients en communautaire.

La domination de la niche rectale est un préambule à la colonisation urinaire (192,193). Dès lors, l'administration d'un probiotique de type Nissle ou ABU83972 possédant la triple association îlot sidérophores-microcines, îlot *pks* et locus *iroA*, de façon à occuper durablement la niche rectale et empêcher l'émergence d'une souche UPEC pourrait être une alternative efficace et plus acceptable qu'une instillation intra-urétrale. Le rôle de la flore digestive comme facteur prédisposant des infections urinaires a en effet déjà été évoqué (204), surtout depuis l'observation d'une diminution de la fréquence de survenue des infections urinaires chez des patients ayant bénéficié d'une transplantation de microbiote fécal pour le traitement d'infections récidivantes à *C. difficile* (205). Par rapport à la transplantation de microbiote fécal, l'emploi de souches définies et largement étudiées comme Nissle ou ABU83972 permet de s'affranchir en grande partie des problèmes de variabilités de souches administrées et d'innocuité (celle-ci n'est jamais totalement garantie en cas de transplantation de microbiote fécal, la composition exacte de la préparation étant inconnue). Il conviendrait alors d'utiliser des souches Nissle ou ABU83972 non génotoxiques, mutées dans le site catalytique de ClbP comme proposé dans l'**Article 1**. Afin de conserver une synthèse intacte de N-myristoyl-D-asparagine, dont la fonction biologique n'est pas encore élucidée, un mutant ClbH non génotoxique pourrait aussi être utilisé.

En conclusion, microcines et probiotiques sont des pistes thérapeutiques prometteuses dans la lutte contre certaines pathologies bactériennes. Cependant, de nombreuses inconnues demeurent dans les mécanismes de leur action thérapeutique et nos travaux ont montré que les intrications sont fortes entre facteurs de virulence et déterminants de l'activité probiotique. Dans ce contexte, les liens entre recherche fondamentale et recherche appliquée semblent plus que jamais nécessaires pour proposer des alternatives thérapeutiques innovantes et sûres.

## Perspectives

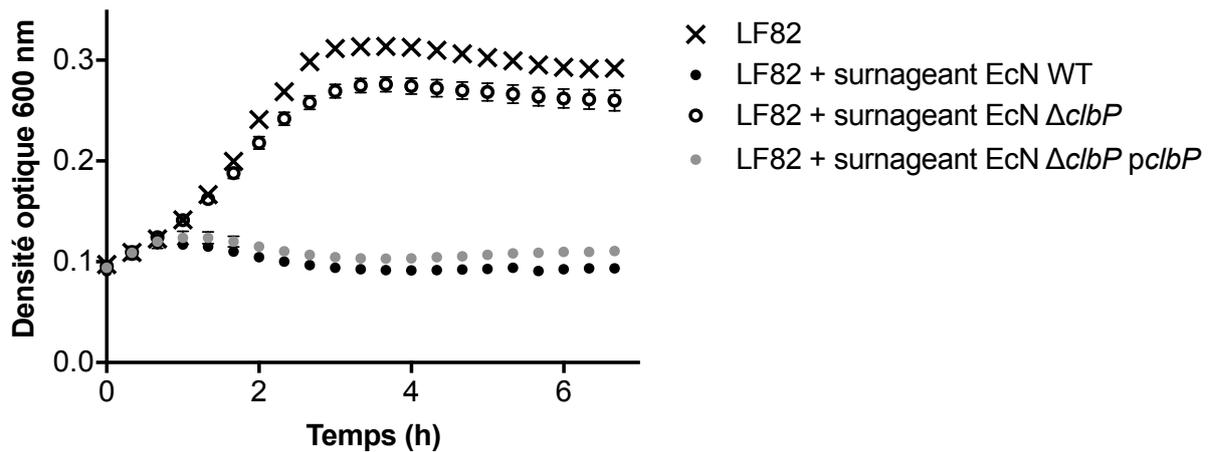
### Une nouvelle famille de sidérophores-microcines issue des souches avec un îlot génomique tronqué

Suite à l'**Article 1**, nous suspectons que les sidérophores-microcines H47 et M produites par les souches de *E. coli* présentant un îlot génomique tronqué soient structurellement différentes de celles produites par les souches possédant un îlot « non tronqué » comme les souches CA58 ou CA46. Nous avons pu déterminer que l'homologue IroB de la protéine McmL manquante chez *E. coli* Nissle assurait la glycosylation du groupement sidérophore, permettant ainsi la liaison de ce groupement avec le précurseur peptidique. Cependant, nous n'avons pas trouvé de protéine suppléant l'activité de linéarisation de l'entérobactine de l'estérase McmK manquante. En effet, l'homologue IroD de McmK ne remplit pas cette fonction. Il est ainsi probable que le groupement dérivé de l'entérobactine des sidérophores-microcines de *E. coli* Nissle ne soit pas linéarisé mais cyclique.

Nous souhaiterions prouver cette structure singulière des sidérophores-microcines des souches de *E. coli* présentant un îlot génomique tronqué par une caractérisation chimique de ces molécules. Pour ce faire, nous collaborons avec l'équipe du Pr Sylvie Rebuffat (UMR7245, CNRS-MNHN, Paris) qui a caractérisé initialement les sidérophores-microcines H47 et M (93). Nous avons déterminé que les surnageants de culture de *E. coli* Nissle présentaient une activité antagoniste ClbP-dépendante (**Figure 29**).

Cependant, la reproductibilité de ces résultats est aléatoire en fonction des lots de surnageants. Certains surnageants de culture de la souche *E. coli* Nissle sauvage ne possèdent pas d'activité antagoniste. Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées : une instabilité des microcines produites, une chélation par le plastique du matériel utilisé ou les filtres stérilisants, une non production des microcines dans certaines conditions, une résistance de la souche LF82 dans certaines conditions ...

Il s'agit désormais d'optimiser les conditions de culture et augmenter si possible les concentrations en microcines tout en limitant les interférences pour rendre possible l'analyse chimique.



**Figure 29 : Courbes de croissance de la souche LF82 en contact avec des surnageants de culture de *E. coli* Nissle**

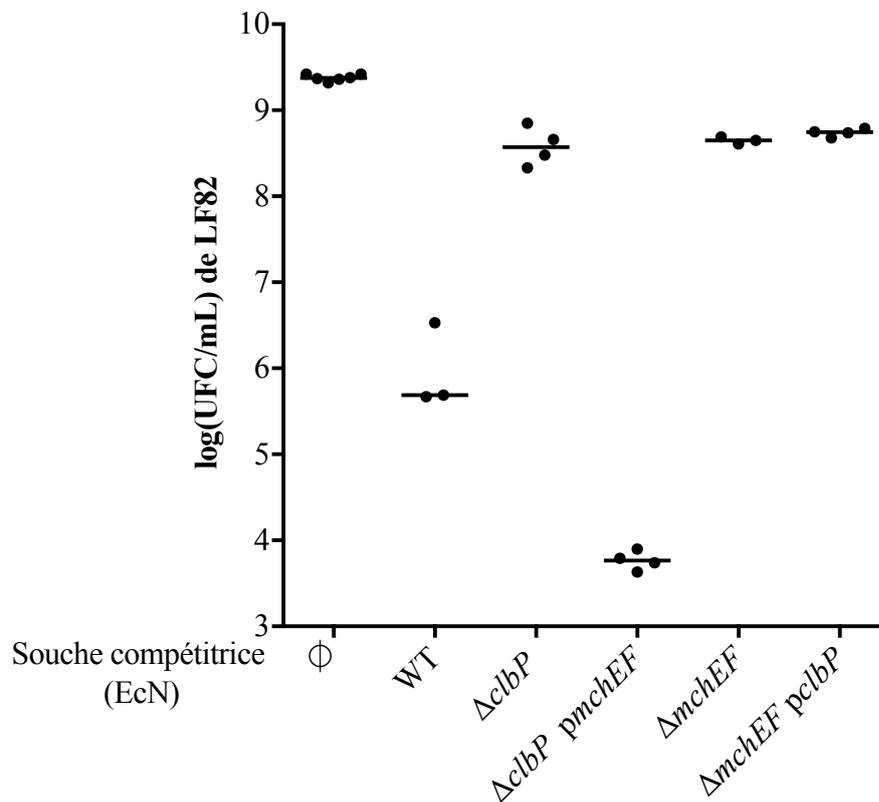
Chaque point est la moyenne de la densité optique obtenue dans 5 puits de plaque 96 puits contenant LF82 cultivée en milieu minimum (100  $\mu$ L de M63) avec des surnageants (100  $\mu$ L) de culture de la souche *E. coli* Nissle sauvage, mutée pour ClbP ( $\Delta clbP$ ) et complétée ( $\Delta clbP pclbP$ ). A l'issue de 6h de culture, les surnageants sont centrifugés (10 000 rpm) et stérilisés par filtration.

### ClbP, un cofacteur de l'export des sidérophores-microcines

Nous avons établi dans l'**Article 1** que la production des sidérophores-microcines H47 et M par les souches de *E. coli* présentant un îlot génomique tronqué fait intervenir le domaine C-terminal de la peptidase ClbP et non pas son site catalytique. Nous souhaiterions déterminer quelle structure précise de ClbP intervient dans la synthèse des sidérophores-microcines par des expériences de mutagenèse. La différence de structure des sidérophores-microcines pourrait rendre indispensable la coopération du domaine C-terminal transmembranaire de ClbP probablement pour l'extrusion des sidérophores-microcines *via* une pompe à efflux qui est, elle conservée entre les différents îlots.

Ce rôle du domaine C-terminal de ClbP comme cofacteur de l'export des sidérophores-microcines nous est suggéré par des expériences de surexpression des gènes de la pompe MchEF dans un mutant ClbP. L'effet antagoniste de Nissle contre LF82 est alors restauré. A l'inverse, la surexpression de ClbP dans une souche mutée pour MchEF ne restaure pas l'effet inhibiteur de Nissle (**Figure 30**).

ClbP n'est donc plus indispensable à la production des microcines quand la pompe à efflux spécifique est surexprimée. Cette surexpression pourrait être suffisante pour compenser une mauvaise affinité des sidérophores-microcines de Nissle pour la pompe MchEF.



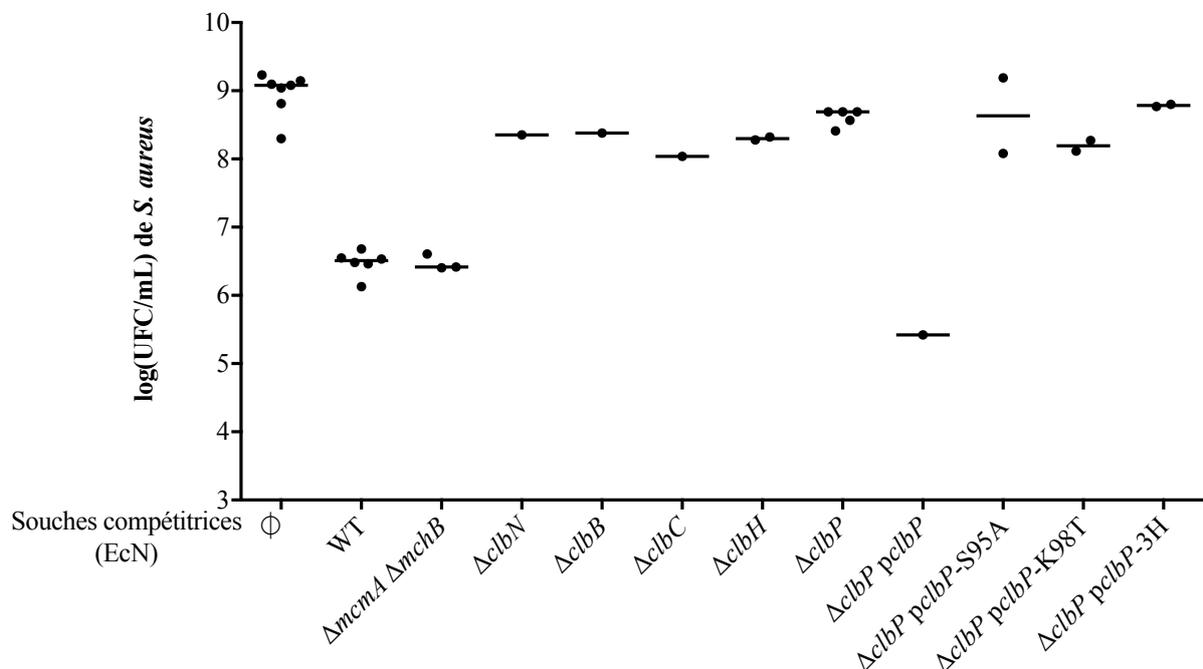
**Figure 30** : ClbP, un cofacteur de MchEF pour l'export des sidérophores-microcines chez *E. coli* Nissle

Dénombrement de la souche *E. coli* LF82 après 24h de co-culture en milieu minimum M63 avec la souche *E. coli* Nissle (EcN) sauvage (WT), mutée pour *clbP* ( $\Delta clbP$ ), mutée pour *clbP* avec une surexpression plasmidique de MchEF ( $\Delta clbP pmchEF$ ), mutée pour *mchEF* ( $\Delta mchEF$ ), et mutée pour *mchEF* avec une surexpression plasmidique de ClbP ( $\Delta mchEF pclbP$ ). LF82 a aussi été cultivée seule comme contrôle ( $\emptyset$ ).

Pour étayer l'hypothèse d'un rôle de ClbP dans l'extrusion des sidérophores-microcines, nous souhaiterions réaliser des marquages de ClbP et de la protéine ABC MchF pour visualiser une éventuelle co-localisation en microscopie.

## Effet anti-staphylococcique dépendant de l'îlot *pks*, mais sans lien avec les microcines

Dans l'**Article 1**, nous démontrons l'intervention nécessaire de ClbP dans la production de sidérophores-microcines chez *E. coli* Nissle. Or, une souche portant l'îlot *pks*, mais incapable de produire des microcines a été montrée comme ayant un effet antibiotique contre des souches de staphylocoques (165). Nous avons vérifié que *E. coli* Nissle exerçait bien une activité antagoniste sur des souches de staphylocoques, indépendamment du système microcines. En effet, le mutant de la souche Nissle pour les deux précurseurs des microcines H47 et M conserve une activité inhibitrice contre une souche de *S. aureus* sensible à la méticilline (**Figure 31**).



**Figure 31** : Effet anti-staphylococcique de *E. coli* Nissle dépendant de l'îlot *pks* mais pas des sidérophores-microcines

Dénombrement de la souche *S. aureus* ATCC 29213 après 24h de co-culture en milieu DMEM Glutamax + SVF avec la souche *E. coli* Nissle (EcN) sauvage (WT), mutée pour *clbN*, *clbB*, *clbC*, *clbH*, ou *clbP*, puis complétée par ClbP (*pclbP*), par ClbP porteur d'une mutation S95A (*pclbP-S95A*) ou K98T (*pclbP-K98T*) dans le site catalytique et par le domaine C-terminal de ClbP seul (*pclbP-3H*). LF82 a aussi été cultivée seule comme contrôle (∅).

Nous avons ensuite testé l'activité anti-staphylococcique de différents mutants de la souche Nissle dans l'îlot *pks*. Cet effet dépend de l'activité peptidase de ClbP, puisque les plasmides portant une mutation dans le site catalytique de ClbP ne

restaurent pas l'activité. A la différence de l'activité antagoniste liée aux sidérophores-microcines, le domaine C-terminal seul de ClbP ne suffit pas à restaurer l'activité du mutant pour ClbP.

Cette activité anti-staphylococcique serait liée à la colibactine elle-même, ou à un métabolite produit par l'îlot *pks*, différent du produit de clivage de la précolibactine. En effet, les mutants *clbC* et *clbH* sont dépourvus d'activité anti-staphylococcique, alors que ces gènes n'interviennent pas dans la synthèse du N-myristoyl-D-asparagine (**Figure 31**), à la différence de *clbN*, *clbB* et *clbP*. Des résultats similaires ont été obtenus avec une souche de *S. aureus* résistant à la méticilline (NCTC 12493). L'effet anti-staphylococcique de *E. coli* Nissle est même plus marqué (moyenne de  $10^5$  UFC/mL de *S. aureus* après 24h de co-culture avec une souche sauvage)

Pour déterminer plus précisément le mécanisme de cette activité anti-staphylococcique, nous allons étudier par des tests morphologiques et fonctionnels l'effet d'une souche produisant l'îlot *pks* sur des staphylocoques (recherche d'un effet génotoxique par exemple). Il conviendra également de tester l'effet de surnageants de cultures pour déterminer si l'effet anti-staphylococcique est contact dépendant ou lié à des molécules sécrétées.

## **Les microcines et la lutte contre le portage digestif d'entérobactéries multi-résistantes**

Le principal réservoir de bacilles à Gram négatif multi-résistants est le tube digestif. Cette colonisation asymptomatique est la première étape dans le développement d'une infection et peut être une source d'épidémies en milieu hospitalier. Les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu sont les bactéries multi-résistantes les plus fréquentes. En France, le portage digestif d'entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu a ainsi été estimé à environ 10% en communautaire (206) et 17% en milieu hospitalier (207). Il s'agit dans la grande majorité des cas de souches de *E. coli*. La maîtrise, voire la réduction du portage de ces entérobactéries multi-résistantes et hautement résistantes si l'on ajoute le problème des carbapénémases est un enjeu dans le milieu hospitalier.

Face à ce problème, une expertise concernant les microcines peut présenter un intérêt double. Afin de mieux comprendre les mécanismes de persistance des souches de *E. coli* multi-résistantes au niveau intestinal, hors pression antibiotique, il conviendrait tout d'abord de déterminer la prévalence des souches productrices de microcines parmi ces souches par rapport à des souches fécales « classiques ». En parallèle, nous pourrions déterminer la sensibilité des souches multi-résistantes à diverses microcines (sidérophores-microcines et microcines lasso). En effet, l'utilisation des microcines semble être une alternative prometteuse aux antibiotiques pour tenter d'éradiquer le portage digestif d'entérobactéries multi-résistantes en raison de leur spectre d'activité restreint qui préserve notamment les bactéries anaérobies intestinales.

Nous envisageons de modifier une souche de *E. coli* Nissle non génotoxique (décrite dans l'**Article 1**) de façon à lui faire synthétiser la microcine lasso J25, en plus de ses deux sidérophores-microcines H47 et M. Comme ces trois microcines ont des modes d'action distincts (inhibition de l'ARN polymérase et des ATP synthases membranaires), cela limiterait le risque d'émergence de résistances.

L'activité antagoniste de cette souche contre des entérobactéries multi-résistantes serait déterminée. Enfin, un modèle murin de colonisation par une souche d'*E. coli* multi-résistante est développé au laboratoire. Ce modèle pourrait être utilisé pour tester l'efficacité de la souche Nissle modifiée dans l'éradication des entérobactéries multi-résistantes.

## Conclusion générale

En conclusion, notre travail a permis de montrer que la production des sidérophores-microcines chez *E. coli* Nissle nécessite l'intervention de protéines de deux systèmes génétiques distincts, en plus de l'îlot microcines : le locus *iroA* et l'îlot *pks*. Les inter-dépendances entre ces différents déterminants complexifie la distinction entre facteur de virulence et facteur de colonisation. Ainsi, selon qu'elle est impliquée dans la synthèse des sidérophores-microcines ou de la colibactine, la peptidase ClbP est respectivement un déterminant de l'activité probiotique de Nissle ou un facteur de virulence.

La frontière entre facteur de colonisation ou déterminant de l'activité probiotique et facteur de virulence apparaît d'autant plus floue que la triple association synergique entre îlot microcines, îlot *pks* et locus *iroA* semble jouer un rôle dans la physiopathologie des infections urinaires en favorisant la domination de la niche rectale par les UPEC. La pléiotropie de certaines protéines d'îlots génomiques expliquerait la faculté d'adaptation des souches du groupe B2 à des environnements variés : elles expriment divers facteurs de virulence en fonction de la niche qu'elles occupent. Cette multiplication des facteurs de virulence n'est possible qu'avec l'optimisation des systèmes de biosynthèse, et en particulier l'économie de « ressources génétiques ».

Au total, la découverte du rôle de l'association îlot microcines, îlot *pks* et locus *iroA* comme déterminant majeur de colonisation chez *E. coli* fait émerger des pistes de recherches en matière de physiopathologie des infections liées à *E. coli* (en particulier aux souches du phylogroupe B2) et de thérapeutiques alternatives aux antibiotiques



**LISTE DES PUBLICATIONS ET**  
**PRESENTATIONS**

## Liste des publications

\_ Amoureux L, Bador J, Fardeheb S, Mabilille C, Couchot C, Massip C, Salignon AL, Berlie G, Varin V, Neuwirth C, Detection of *Achromobacter xylosoxidans* in hospital, domestic, and outdoor environmental samples and comparison with human clinical isolates. **Appl Environ Microbiol** 2013; 79:7142–9. (IF : 3,633)

\_ Massip C, Descours G, Ginevra C, Doublet P, Jarraud S, Gilbert C., Macrolide resistance in *Legionella pneumophila*: the role of LpeAB efflux pump. **J Antimicrob Chemother** 2017; 72:1327–33. (IF : 5,217)

\_ Vandewalle-Capo M, Massip C, Descours G, Charavit J, Chastang J, Billy PA, Boisset S, Lina G, Gilbert C, Maurin M, Jarraud S, Ginevra C, Minimum inhibitory concentration (MIC) distribution among wild-type strains of *Legionella pneumophila* identifies a subpopulation with reduced susceptibility to macrolides owing to efflux pump genes. **Int J Antimicrob Agents** 2017; 50:684–9 (IF : 4,253)

\_ Massip C, Guet-Revillet H, Grare M, Sommet A, Dubois D, Enhanced culture recovery of *Campylobacter* with modified Cary-Blair medium: a practical field experience. **J Microbiol Methods**. 2018; 149:53-4 (IF : 1,701)

\_ Massip C, Mathieu C, Gaudru C, Miaut V, Floch P, Oswald E, Segonds C, Guet-Revillet H. *In vitro* activity of seven  $\beta$ -lactams including ceftolozane/tazobactam and ceftazidime/avibactam against *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia gladioli* and other non-fermentative Gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. **J Antimicrob Chemother**. 2019; 74:525-528. (IF : 5,217)

## Liste des présentations orales

### Congrès internationaux

\_ **Garnier L**, Massip C, Viel S, Bienvenu J, Bienvenu F. Sensitization to Cor a 14 and Cor a 9 is a risk marker for severe hazelnut allergy in children ; 5<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Allergology (ISMA), Vienne, 6-7 Décembre 2013

\_ **Massip C**, Gilbert C, Ginevra C, Doublet P, Jarraud S, Descours G. Role of two genes of putative efflux pump in macrolide resistance of *Legionella pneumophila* ; 3e conférence scientifique annuelle de l'ESCMID Study Group for *Legionella* Infections (ESGLI). Londres, 16-17 Septembre 2015

\_ **Massip C**, Raynaud JV, Charavit J, Billy PA, Almahmoud I, Beraud L, Ranc AG, Boisset S, Maurin M, Ginevra C, Jarraud S, Descours G. The broth microdilution method allows for the detection of macrolides, fluoroquinolones and rifampicin resistant *Legionella pneumophila* ; 3e conférence scientifique annuelle de l'ESGLI. Londres, 16-17 Septembre 2015

## **Congrès nationaux**

\_ **Massip C**, Gilbert C, Ginevra C, Doublet P, Jarraud S, Descours G; Rôle de Lpp2879-2880 dans la résistance de *Legionella pneumophila* aux macrolides, Sympo Légio. *Legionella* de l'environnement à l'homme, Lyon, 17-18 novembre 2015

\_ **Massip C**, Branchu P, Zirah S, Chagneau C, Sécher T, Boury M, Dubois D, Nougayrède JP, Rebuffat S, Oswald E. Interplay between colibactin and microcins production in *Escherichia coli* ; Congrès National de la Société Française de Microbiologie (SFM), Paris, 9-11 octobre 2017

## **Liste des communications affichées**

### **Congrès internationaux**

- Charre C, **Massip C**, Durous L, Bouveyron C, Vandenesch F. Seesaw effect: unpredictable magnitude and not on methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* ; 25<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Copenhagen, Danemark, 25-28 Avril 2015

### **Congrès nationaux**

- **Massip C**, Raynaud JV, Charavit J, Billy PA, Almahmoud I, Beraud L, Ranc AG, Boisset S, Maurin M, Ginevra C, Lina G, Jarraud S, Descours G. Distribution des CMI des souches de *Legionella pneumophila* résistantes et sensibles aux macrolides, aux fluoroquinolones ou à la rifampicine ; Sympo Légio. *Legionella* de l'environnement à l'homme, Lyon, 17-18 novembre 2015

- **Massip C**, Raynaud JV, Charavit J, Billy PA, Almahmoud I, Beraud L, Ranc AG, Boisset S, Maurin M, Ginevra C, Lina G, Jarraud S, Descours G. Distribution des CMI des souches de *Legionella pneumophila* résistantes et sensibles aux macrolides, aux fluoroquinolones ou à la rifampicine ; 35<sup>e</sup> Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI), Paris, 14-15 Décembre 2015

- **Massip C**, Gilbert C, Doublet P, Jarraud S, Descours G. Deux gènes de pompe à efflux associés à une résistance aux macrolides spécifique de clones de *Legionella pneumophila* ; 35<sup>e</sup> RICAI, Paris, 14-15 Décembre 2015

- **Massip C**, Mathieu C., Gaudru C., Miaut V., Floch P., Oswald E., Segonds C., Guet-Revillet H. Nouvelles associations de  $\beta$ -lactamines et bacilles non-fermentants atypiques ; 38<sup>ème</sup> RICAI, Paris, 17-18 Décembre 2018

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004 Feb;2(2):123–40.
2. Vila J, Sáez-López E, Johnson JR, Römling U, Dobrindt U, Cantón R, *et al.* *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. FEMS Microbiol Rev. 2016 Jul 1;40(4):437–63.
3. Jauregui 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 Nov 26;9:560.
4. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environ Microbiol Rep. 2013 Feb 1;5(1):58–65.
5. Touchon M, Hoede C, Tenaillon 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 Jan 23;5(1).
6. Dale AP, Woodford N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): disease, carriage and clones. J Infect. 2015 décembre;71(6):615–26.
7. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2010 Mar;8(3):207–17.
8. Sonnenborn U, Schulze J. The non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 – features of a versatile probiotic. Microb Ecol Health Dis. 2009 Sep;21(3/4):122–58.
9. Patzer SI. The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN. Microbiology. 2003 Sep 1;149(9):2557–70.
10. 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 Dec 8;540(7632):280–3.
11. 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 Aug 11;313(5788):848–51.
12. 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 Sep 1;83(9):3704–11.
13. 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 Jul 15;210(2):285–94.
14. 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 Oct 5;338(6103):120–3.

15. 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 Feb 14;8(2).
16. Sonnenborn U. *Escherichia coli* strain Nissle 1917—from bench to bedside and back: history of a special *Escherichia coli* strain with probiotic properties. FEMS Microbiol Lett. 2016 Oct 1;363(19).
17. Wassenaar TM. Insights from 100 years of research with probiotic *E. coli*. Eur J Microbiol Immunol. 2016 Sep 29;6(3):147–61.
18. Hancock V, Vejborg RM, Klemm P. Functional genomics of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and 83972, and UPEC strain CFT073: comparison of transcriptomes, growth and biofilm formation. Mol Genet Genomics MGG. 2010 Dec;284(6):437–54.
19. Cress BF, Linhardt RJ, Koffas MAG. Draft genome sequence of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (serovar O6:K5:H1). Genome Announc. 2013 Feb 28;1(2).
20. Reister M, Hoffmeier K, Krezdorn N, Rotter B, Liang C, Rund S, *et al.* Complete genome sequence of the gram-negative probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. J Biotechnol. 2014 Oct 10;187:106–7.
21. Boudeau J, Glasser A-L, Julien S, Colombel J-F, Darfeuille-Michaud A. Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent–invasive *Escherichia coli* strains isolated from patients with Crohn’s disease. Aliment Pharmacol Ther. 2003 Jul;18(1):45–56.
22. Altenhoefer A, Oswald S, Sonnenborn U, Enders C, Schulze J, Hacker J, *et al.* The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. FEMS Immunol Med Microbiol. 2004;40(3):223–9.
23. Deriu E, Liu JZ, Pezeshki M, Edwards RA, Ochoa RJ, Contreras H, *et al.* Probiotic bacteria reduce *Salmonella* Typhimurium intestinal colonization by competing for iron. Cell Host Microbe. 2013 Jul 17;14(1):26.
24. Rund SA, Rohde H, Sonnenborn U, Oelschlaeger TA. Antagonistic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on EHEC strains of serotype O104:H4 and O157:H7. Int J Med Microbiol IJMM. 2013 Jan;303(1):1–8.
25. Mohsin M, Guenther S, Schierack P, Tedin K, Wieler LH. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 reduces growth, Shiga toxin expression, release and thus cytotoxicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Int J Med Microbiol. 2015 Jan 1;305(1):20–6.
26. Henker J, Laass M, Blokhin BM, Bolbot YK, Maydannik VG, Elze M, *et al.* The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. Eur J Pediatr. 2007 Apr;166(4):311–8.
27. Henker J, Laass MW, Blokhin BM, Maydannik VG, Bolbot YK, Elze M, *et al.* Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 versus placebo for treating diarrhea of greater than 4 days duration in infants and toddlers. Pediatr Infect Dis J. 2008 Jun 1;27(6):494–9.
28. Vlasova AN, Shao L, Kandasamy S, Fischer DD, Rauf A, Langel SN, *et al.* *Escherichia coli* Nissle 1917 protects gnotobiotic pigs against human rotavirus by modulating pDC and NK-cell responses. Eur J Immunol. 2016 Oct;46(10):2426–37.

29. Ukena SN, Singh A, Dringenberg U, Engelhardt R, Seidler U, Hansen W, *et al.* Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. PLoS ONE. 2007 Dec 12;2(12).
30. Bär F, Koschitzky HV, Roblick U, Bruch HP, Schulze L, Sonnenborn U, *et al.* Cell-free supernatants of *Escherichia coli* Nissle 1917 modulate human colonic motility: evidence from an in vitro organ bath study. Neurogastroenterol Motil. 2009;21(5):559-e17.
31. Philippe Ducrotté. Physiopathologie des troubles fonctionnels intestinaux et implications thérapeutiques [Internet]. Association française de formation médicale continue en hépato-gastro-entérologie. 2013 [cited 2019 Jan 17]. Available from: <https://www.fmcgastro.org/wp-content/uploads/file/pdf-2013/intestin-irritable.pdf>
32. Kruis W, Chrubasik S, Boehm S, Stange C, Schulze J. A double-blind placebo-controlled trial to study therapeutic effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in subgroups of patients with irritable bowel syndrome. Int J Colorectal Dis. 2012 Apr;27(4):467–74.
33. Faghihi AH, Agah S, Masoudi M, Ghafoori SMS, Eshraghi A. Efficacy of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in patients with irritable bowel syndrome: a double blind placebo-controlled randomized trial. Acta Med Indones. 2015;47(3):8.
34. Schultz M, Schölmerich J, Rath HC. Rationale for probiotic and antibiotic treatment strategies in inflammatory bowel diseases. Dig Dis. 2003;21(2):105–28.
35. Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. Gastroenterology. 2011 May;140(6):1720–8.
36. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, *et al.* Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. Gastroenterology. 1998 Dec 1;115(6):1405–13.
37. Boudeau J, Glasser A-L, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. Infect Immun. 1999 Sep;67(9):4499–509.
38. Mazzarella G, Perna A, Marano A, Lucariello A, Aufiero VR, Sorrentino A, *et al.* Pathogenic role of associated adherent-invasive *Escherichia coli* in Crohn's disease. J Cell Physiol. 2017;232(10):2860–8.
39. Huebner C, Ding Y, Petermann I, Knapp C, Ferguson LR. The probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 reduces pathogen invasion and modulates cytokine expression in Caco-2 cells infected with Crohn's disease-associated *E. coli* LF82. Appl Environ Microbiol. 2011 Apr 1;77(7):2541–4.
40. Rolfe VE, Fortun PJ, Hawkey CJ, Bath-Hextall FJ. Probiotics for maintenance of remission in Crohn's disease. Cochrane Database Syst Rev. 2006;(4).
41. Malchow HA. Crohn's disease and *Escherichia coli*: a new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? J Clin Gastroenterol. 1997 Dec 1;25(4):653–8.
42. Losurdo G, Iannone A, Contaldo A, Ierardi E, Di Leo A, Principi M. *Escherichia coli* Nissle 1917 in ulcerative colitis treatment: systematic review and meta-analysis. J Gastrointest Liver Dis JGLD. 2015 Dec;24(4):499–505.

43. Durack J, Lynch SV. The gut microbiome: relationships with disease and opportunities for therapy. *J Exp Med*. 2019 Jan 7;216(1):20–40.
44. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, *et al*. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018 Mar 1;18(3):318-27.
45. Forkus B, Ritter S, Vlysidis M, Geldart K, Kaznessis YN. Antimicrobial Probiotics Reduce *Salmonella enterica* in Turkey Gastrointestinal Tracts. *Sci Rep*. 2017 Jan 17;7:40695.
46. Hwang IY, Koh E, Wong A, March JC, Bentley WE, Lee YS, *et al*. Engineered probiotic *Escherichia coli* can eliminate and prevent *Pseudomonas aeruginosa* gut infection in animal models. *Nat Commun*. 2017 Apr 11;8.
47. Geldart KG, Kommineni S, Forbes M, Hayward M, Dunny GM, Salzman NH, *et al*. Engineered *E. coli* Nissle 1917 for the reduction of vancomycin-resistant *Enterococcus* in the intestinal tract. *Bioeng Transl Med*. 2018 Sep 8;3(3):197–208.
48. Morelli L, Capurso L. FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later. *J Clin Gastroenterol*. 2012 Oct 1;46.
49. Grozdanov L, Raasch C, Schulze J, Sonnenborn U, Gottschalk G, Hacker J, *et al*. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol*. 2004 Aug;186(16):5432–41.
50. Blum-Oehler G, Oswald S, Eiteljörge K, Sonnenborn U, Schulze J, Kruis W, *et al*. Development of strain-specific PCR reactions for the detection of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 in fecal samples. *Res Microbiol*. 2003 Jan;154(1):59-66.
51. Lasaro MA, Salinger N, Zhang J, Wang Y, Zhong Z, Goulian M, *et al*. F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the *Escherichia coli* commensal strain Nissle 1917. *Appl Env Microbiol*. 2009 Jan 1;75(1):246–51.
52. Monteiro C, Saxena I, Wang X, Kader A, Bokranz W, Simm R, *et al*. Characterization of cellulose production in *Escherichia coli* Nissle 1917 and its biological consequences. *Environ Microbiol*. 2009;11(5):1105–16.
53. Troge A, Scheppach W, Schroeder BO, Rund SA, Heuner K, Wehkamp J, *et al*. More than a marine propeller – the flagellum of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 is the major adhesin mediating binding to human mucus. *Int J Med Microbiol*. 2012 Dec 1;302(7):304–14.
54. Hancock V, Dahl M, Klemm P. Probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 outcompetes intestinal pathogens during biofilm formation. *J Med Microbiol*. 2010;59(4):392–9.
55. Klemm P, Vejborg RM, Hancock V. Prevention of bacterial adhesion. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010 Sep 1;88(2):451–9.
56. Klemm P, Hancock V, Schembri MA. Fimbrial adhesins from extraintestinal *Escherichia coli*. *Environ Microbiol Rep*. 2010;2(5):628–40.
57. Jacobi CA, Malfertheiner P. *Escherichia coli* Nissle 1917 (Mutaflor): new insights into an old probiotic bacterium. *Dig Dis*. 2011;29(6):600–7.

58. Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, Oelschlaeger TA, Stange EF, Fellermann K. Induction of human  $\beta$ -defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immun*. 2007 May 1;75(5):2399–407.
59. Šplíchal I, Fagerhol MK, Trebichavský I, Šplíchalová A, Schulze J. The effect of intestinal colonization of germ-free pigs with *Escherichia coli* on calprotectin levels in plasma, intestinal and bronchoalveolar lavages. *Immunobiology*. 2005 Mar 15;209(9):681–7.
60. Hafez M, Hayes K, Goldrick M, Grecis RK, Roberts IS. The K5 capsule of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 is important in stimulating expression of Toll-like receptor 5, CD14, MyD88, and TRIF together with the induction of interleukin-8 expression via the mitogen-activated protein kinase pathway in epithelial cells. *Infect Immun*. 2010 May;78(5):2153–62.
61. Hafez M, Hayes K, Goldrick M, Warhurst G, Grecis R, Roberts IS. The K5 capsule of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 is important in mediating interactions with intestinal epithelial cells and chemokine induction. *Infect Immun*. 2009 Jul 1;77(7):2995–3003.
62. Sturm A, Rilling K, Baumgart DC, Gargas K, Abou-Ghazalé T, Raupach B, *et al.* *Escherichia coli* Nissle 1917 distinctively modulates T-cell cycling and expansion via Toll-like receptor 2 signaling. *Infect Immun*. 2005 Mar;73(3):1452–65.
63. Fábrega M-J, Rodríguez-Nogales A, Garrido-Mesa J, Algieri F, Badía J, Giménez R, *et al.* Intestinal anti-inflammatory effects of outer membrane vesicles from *Escherichia coli* Nissle 1917 in DSS-experimental colitis in mice. *Front Microbiol*. 2017 Jul 11;8.
64. Fischbach MA, Lin H, Liu DR, Walsh CT. How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. *Nat Chem Biol*. 2006 Mar;2(3):132–8.
65. Martin P, Tronnet S, Garcie C, Oswald E. Interplay between siderophores and colibactin genotoxin in *Escherichia coli*. *IUBMB Life*. 2017 Mar 1.
66. Wilson BR, Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K, Tsuji Y. Siderophores in iron metabolism: from mechanism to therapy potential. *Trends Mol Med*. 2016 Dec;22(12):1077–90.
67. Fischbach MA, Walsh CT. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem Rev*. 2006 Aug 9;106(8):3468–96.
68. Weissman KJ. The structural biology of biosynthetic megaenzymes. *Nat Chem Biol*. 2014 Sep;11(9):660–70.
69. Garenaux A, Caza M, Dozois CM. The ins and outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol*. 2011 Nov 21;153(1-2):89-98.
70. Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007 Sep;71(3):413-451.
71. Krewulak KD, Vogel HJ. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim Biophys Acta-Biomembr*. 2008 Sep;1778(9):1781–804.
72. Hantke K. Dihydroxybenzoylserine-a siderophore for *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 1990 Jan;67(1–2):5–8.

73. Zhu M, Valdebenito M, Winkelmann G, Hantke K. Functions of the siderophore esterases IroD and IroE in iron-salmochelin utilization. *Microbiology*. 2005;151(7):2363–72.
74. 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 Oct 31;103(44):16502–7.
75. Schubert S, Rakin A, Heesemann J. The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int J Med Microbiol*. 2004 Sep;294(2–3):83–94.
76. Hancock V, Ferrieres L, Klemm P. The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiol-Sgm*. 2008 Jan;154:167–75.
77. Koh E-I, Henderson JP. Microbial copper-binding siderophores at the host-pathogen interface. *J Biol Chem*. 2015 Jul 31;290(31):18967–74.
78. Carbonetti N, Boonchai S, Parry S, Vaisanenrhen V, Korhonen T, Williams P. Aerobactin-mediated iron uptake by *Escherichia coli* isolates from human extraintestinal infections. *Infect Immun*. 1986 Mar;51(3):966–8.
79. Ling J, Pan H, Gao Q, Xiong L, Zhou Y, Zhang D, *et al*. Aerobactin synthesis genes *iucA* and *iucC* contribute to the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli* O2 strain E058. *Plos One*. 2013 Feb 27;8(2):e57794.
80. 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 Dec 4;296(8):513–20.
81. Vejborg RM, Friis C, Hancock V, Schembri MA, Klemm P. A virulent parent with probiotic progeny: comparative genomics of *Escherichia coli* strains CFT073, Nissle 1917 and ABU 83972. *Mol Genet Genomics*. 2010 Mar 31;283(5):469–84.
82. Zdziarski J, Svanborg C, Wullt B, Hacker J, Dobrindt U. Molecular basis of commensalism in the urinary tract: low virulence or virulence attenuation? *Infect Immun*. 2008 Feb;76(2):695–703.
83. Johnson JR, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E. coli*”. *J Lab Clin Med*. 2002 Mar 1;139(3):155–62.
84. Grozdanov L, Zähringer U, Blum-Oehler G, Brade L, Henne A, Knirel YA, *et al*. A single nucleotide exchange in the *wzy* gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol*. 2002 Nov;184(21):5912–25.
85. Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev*. 1995 Jun;59(2):171–200.
86. Asensio C, Pérez-Díaz JC, Martínez MC, Baquero F. A new family of low molecular weight antibiotics from enterobacteria. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976 Mar 8;69(1):7–14.
87. Pons A-M, Lanneluc I, Cottenceau G, Sable S. New developments in non-post translationally modified microcins. *Biochimie*. 2002 May 1;84(5):531–7.
88. Duquesne S, Destoumieux-Garzón D, Peduzzi J, Rebuffat S. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat Prod Rep*. 2007 Jul 25;24(4):708–34.

89. Thomas X, Destoumieux-Garzón D, Peduzzi J, Afonso C, Blond A, Birlirakis N, *et al.* Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J Biol Chem.* 2004 Jul 2;279(27):28233–42.
90. de Lorenzo V, Pugsley AP. Microcin E492, a low-molecular-weight peptide antibiotic which causes depolarization of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985 Apr;27(4):666.
91. Laviña M, Gaggero C, Moreno F. Microcin H47, a chromosome-encoded microcin antibiotic of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1990 Nov;172(11):6585–8.
92. Davies JK, Reeves P. Genetics of resistance to colicins in *Escherichia coli* K-12: cross-resistance among colicins of group A. *J Bacteriol.* 1975 Jul;123(1):102–17.
93. Vassiliadis G, Destoumieux-Garzón D, Lombard C, Rebuffat S, Peduzzi J. Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M and H47. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jan;54(1):288–97.
94. Poey ME, Azpiroz MF, Laviña M. Comparative analysis of chromosome-encoded microcins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Apr;50(4):1411–8.
95. Lagos R, Baeza M, Corsini G, Hetz C, Strahsburger E, Castillo JA, *et al.* Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. *Mol Microbiol.* 2001 Oct 1;42(1):229–43.
96. Gaggero C, Moreno F, Laviña M. Genetic analysis of microcin H47 antibiotic system. *J Bacteriol.* 1993 Sep;175(17):5420–7.
97. Nolan EM, Walsh CT. Investigations of the MceJ-catalyzed posttranslational modification of the microcin E492 C-terminus: linkage of ribosomal and nonribosomal peptides to form “Trojan Horse” antibiotics. *Biochemistry.* 2008 Sep 2;47(35):9289–99.
98. Azpiroz MF, Rodríguez E, Laviña M. The structure, function, and origin of the microcin H47 ATP-binding cassette exporter indicate its relatedness to that of colicin V. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Mar;45(3):969–72.
99. Wilkens M, Villanueva JE, Cofré J, Chnaiderman J, Lagos R. Cloning and expression in *Escherichia coli* of genetic determinants for production of and immunity to microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol.* 1997 Aug;179(15):4789–94.
100. Azpiroz MF, Bascuas T, Laviña M. Microcin H47 system: an *Escherichia coli* small genomic island with novel features. *PLoS ONE.* 2011 Oct 11;6(10).
101. Azpiroz MF, Laviña M. Involvement of enterobactin synthesis pathway in production of microcin H47. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Apr;48(4):1235–41.
102. Destoumieux-Garzón D, Peduzzi J, Thomas X, Djediat C, Rebuffat S. Parasitism of iron-siderophore receptors of *Escherichia coli* by the siderophore-peptide microcin E492m and its unmodified counterpart. *Biometals.* 2006 Apr;19(2):181–91.
103. Nolan EM, Fischbach MA, Koglin A, Walsh CT. Biosynthetic tailoring of microcin E492m: post-translational modification affords an antibacterial siderophore-peptide conjugate. *J Am Chem Soc.* 2007 Nov 21;129(46):14336–47.
104. Vassiliadis G, Peduzzi J, Zirah S, Thomas X, Rebuffat S, Destoumieux-Garzón D. Insight into siderophore-carrying peptide biosynthesis: enterobactin is a precursor for microcin E492 posttranslational modification. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Oct;51(10):3546–53.

105. Corsini G, Baeza M, Monasterio O, Lagos R. The expression of genes involved in microcin maturation regulates the production of active microcin E492. *Biochimie*. 2002 May;84(5–6):539–44.
106. de Lorenzo V. Factors affecting microcin E492 production. *J Antibiot (Tokyo)*. 1985 Mar;38(3):340–5.
107. Destoumieux-Garzón D, Thomas X, Santamaria M, Goulard C, Barthélémy M, Boscher B, *et al*. Microcin E492 antibacterial activity: evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2003;49(4):1031–41.
108. Duquesne S, Petit V, Peduzzi J, Rebuffat S. Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2007;13(4):200–9.
109. Mercado G, Tello M, Marín M, Monasterio O, Lagos R. The production *in vivo* of microcin E492 with antibacterial activity depends on salmochelin and EntF. *J Bacteriol*. 2008 Aug;190(15):5464.
110. Lagos R, Wilkens M, Vergara C, Cecchi X, Monasterio O. Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes. *FEBS Lett*. 1993 Apr 26;321(2–3):145–8.
111. Strahsburger E, Baeza M, Monasterio O, Lagos R. Cooperative Uptake of Microcin E492 by Receptors FepA, Fiu, and Cir and Inhibition by the Siderophore Enterochelin and Its Dimeric and Trimeric Hydrolysis Products. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jul;49(7):3083.
112. Rebuffat S. Microcins in action: amazing defence strategies of enterobacteria. *Biochem Soc Trans*. 2012 Dec 1;40(6):1456–62.
113. Bieler S, Silva F, Soto C, Belin D. Bactericidal activity of both secreted and nonsecreted microcin E492 requires the mannose permease. *J Bacteriol*. 2006 Oct;188(20):7049.
114. Trujillo M, Rodríguez E, Laviña M. ATP synthase is necessary for microcin H47 antibiotic action. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Nov;45(11):3128–31.
115. Rodríguez E, Lavina M. The proton channel is the minimal structure of ATP synthase necessary and sufficient for microcin H47 antibiotic action. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Jan 1;47(1):181–7.
116. Taieb F, Petit C, Nougayrède J-P, Oswald E. The enterobacterial genotoxins: cytolethal distending toxin and colibactin. *EcoSal Plus*. 2016 Jul 14;7(1).
117. Faïs T, Delmas J, Barnich N, Bonnet R, Dalmaso G. Colibactin: more than a new bacterial toxin. *Toxins*. 2018 Apr 10;10(4).
118. 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 Jan 11;1(1):nmicrobiol20159.
119. 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(5):897–908.
120. 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 Oct 1;275(2):255–62.

121. Johnson JR, Johnston B, Kuskowski MA, Nougayrede J-P, Oswald E. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli pks* genomic island. *J Clin Microbiol.* 2008 Dec;46(12):3906–11.
122. 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 Nov 1;77(11):4696–703.
123. Chen Y-T, Lai Y-C, Tan M-C, Hsieh L-Y, Wang J-T, Shiao Y-R, *et al.* Prevalence and characteristics of *pks* genotoxin gene cluster-positive clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan. *Sci Rep.* 2017 Feb 24;7:43120.
124. Lan Y, Zhou M, Jian Z, Yan Q, Wang S, Liu W. Prevalence of *pks* gene cluster and characteristics of *Klebsiella pneumoniae*-induced bloodstream infections. *J Clin Lab Anal.* 2019 Feb 8;e22838.
125. Lai Y-C, Lin A-C, Chiang M-K, Dai Y-H, Hsu C-C, Lu M-C, *et al.* Genotoxic *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PLoS ONE.* 2014;9(5).
126. 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 Jul;15(7):2095–113.
127. Engel P, Vizcaino MI, Crawford JM. Gut symbionts from distinct hosts exhibit genotoxic activity via divergent colibactin biosynthesis pathways. *Appl Environ Microbiol.* 2015 Feb;81(4):1502–12.
128. 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 Sep;53(3–4):180–2.
129. 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 Jun 1;48(6):2122–9.
130. 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 May 1;5(3):313–25.
131. Johnson JR, Porter S, Johnston B, Kuskowski MA, Spurbeck RR, Mobley HLT, *et al.* Host characteristics and bacterial traits predict experimental virulence for *Escherichia coli* bloodstream isolates from patients with urosepsis. *Open Forum Infect Dis.* 2015 Jun 6;2(3).
132. 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 Oct 14;286(41):35562–70.
133. Brotherton CA, Balskus EP. A prodrug resistance mechanism is involved in colibactin biosynthesis and cytotoxicity. *J Am Chem Soc.* 2013 Mar 6;135(9):3359–62.
134. Vizcaino MI, Engel P, Trautman E, Crawford JM. Comparative metabolomics and structural characterizations illuminate colibactin pathway-dependent small molecules. *J Am Chem Soc.* 2014 Jul 2;136(26):9244–7.
135. Vizcaino MI, Crawford JM. The colibactin warhead crosslinks DNA. *Nat Chem.* 2015 May;7(5):411–7.

136. Van Lanen SG. Biosynthesis: SAM cycles up for colibactin. *Nat Chem Biol.* 2017 Oct;13(10):1059–61.
137. 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(5):3154–60.
138. Brachmann AO, Garcia 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 Aug 4;51(66):13138–41.
139. 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 May 20;11(5):1287–95.
140. 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 Oct;12(10):773–5.
141. Shine EE, Xue M, Patel JR, Healy AR, Surovtseva YV, Herzon SB, *et al.* Model colibactins exhibit human cell genotoxicity in the absence of host bacteria. *ACS Chem Biol.* 2018 Nov 7;
142. Trautman EP, Healy AR, Shine EE, Herzon SB, Crawford JM. Domain-targeted metabolomics delineates the heterocycle assembly steps of colibactin biosynthesis. *J Am Chem Soc.* 2017 Mar 22;139(11):4195–201.
143. 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(12):1715–9.
144. Cougnoux A, Gibold L, Robin F, Dubois D, Pradel N, Darfeuille-Michaud A, *et al.* Analysis of structure–function relationships in the colibactin-maturing enzyme ClbP. *J Mol Biol.* 2012 Dec;424(3–4):203–14.
145. Tripathi P, Shine EE, Healy AR, Kim CS, Herzon SB, Bruner SD, *et al.* ClbS is a cyclopropane hydrolase that confers colibactin resistance. *J Am Chem Soc.* 2017 Dec 13;139(49):17719–22.
146. Vizcaino MI, Crawford JM. The colibactin warhead crosslinks DNA. *Nat Chem.* 2015 May;7(5):411–7.
147. Healy AR, Nikolayevskiy H, Patel JR, Crawford JM, Herzon SB. A mechanistic model for colibactin-induced genotoxicity. *J Am Chem Soc.* 2016 Dec 7;138(48):15563–70.
148. Xue M, Shine E, Wang W, Crawford JM, Herzon SB. Characterization of natural colibactin–nucleobase adducts by tandem mass spectrometry and isotopic labeling. Support for DNA alkylation by cyclopropane ring opening. *Biochemistry.* 2018 Nov 13;57(45):6391–4.
149. Bossuet-Greif N, Vignard J, Taieb F, Mirey G, Dubois D, Petit C, *et al.* The colibactin genotoxin generates DNA interstrand cross-links in infected cells. *mBio.* 2018 Mar 20;9(2).
150. Wilson MR, Jiang Y, Villalta PW, Stornetta A, Boudreau PD, Carrá A, *et al.* The human gut bacterial genotoxin colibactin alkylates DNA. *Science.* 2019 Feb 15;363(6428):eaar7785.

151. 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 U S A*. 2010 Jun 22;107(25):11537–42.
152. 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 Oct 8;8(10).
153. 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 Dec;63(12):1932–42.
154. Dalmaso G, Cougnoux A, Delmas J, Darfeuille-Michaud A, Bonnet R. The bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by modifying the tumor microenvironment. *Gut Microbes*. 2014;5(5):675–80.
155. Bonnet M, Buc E, Sauvanet P, Darcha C, Dubois D, Pereira B, *et al*. Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014 Feb 15;20(4):859–67.
156. Tomkovich S, Yang Y, Winglee K, Gauthier J, Mühlbauer M, Sun X, *et al*. Locoregional effects of microbiota in a preclinical model of colon carcinogenesis. *Cancer Res*. 2017 May 15;77(10):2620–32.
157. Payros D, Dobrindt U, Martin P, Secher T, Bracarense APFL, Boury M, *et al*. The food contaminant deoxynivalenol exacerbates the genotoxicity of gut microbiota. *mBio*. 2017 May 3;8(2):e00007-17.
158. Secher T, Payros D, Brehin C, Boury M, Watrin C, Gillet M, *et al*. Oral tolerance failure upon neonatal gut colonization with *Escherichia coli* producing the genotoxin colibactin. *Infect Immun*. 2015 Jun;83(6):2420–9.
159. Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Virulence*. 2013 Feb 15;4(2):107–18.
160. Kim D, Park BY, Choi MH, Yoon E-J, Lee H, Lee KJ, *et al*. Antimicrobial resistance and virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* affecting 30 day mortality in patients with bloodstream infection. *J Antimicrob Chemother*. 2019 Jan 1;74(1):190–9.
161. Lu M-C, Chen Y-T, Chiang M-K, Wang Y-C, Hsiao P-Y, Huang Y-J, *et al*. Colibactin contributes to the hypervirulence of *pks+* K1 CC23 *Klebsiella pneumoniae* in mouse meningitis infections. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 Mar 31;7.
162. 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 Jul;9(7).
163. Pérez-Berezo T, Pujo J, Martin P, Faouder P, Galano J-M, Guy A, *et al*. Identification of an analgesic lipopeptide produced by the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Nat Commun*. 2017 Nov 3;8(1):1314.
164. 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 Nov 1;3(6):501–9.

165. Faïs T, Cougnoux A, Dalmasso G, Laurent F, Delmas J, Bonnet R. Antibiotic activity of *Escherichia coli* against multiresistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Nov;60(11):6986.
166. Fischbach MA, Lin H, Liu DR, Walsh CT. *In vitro* characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jan 18;102(3):571.
167. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol*. 2015 May;13(5):269–84.
168. Hagan EC, Donnenberg MS, Mobley HLT. Uropathogenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*. 2013 Dec 3;1(8).
169. Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF). Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires de l'adulte (argumentaire) [Internet]. 2014. Available from: [http://www.infectiologie.com/site/medias/Recos/2014-infections\\_urinaires-long.pdf](http://www.infectiologie.com/site/medias/Recos/2014-infections_urinaires-long.pdf)
170. Nicolle LE, Bradley S, Colgan R, Rice JC, Schaeffer A, Hooton TM. Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clin Infect Dis*. 2005 Mar 1;40(5):643–54.
171. Nicolle LE. Urinary infections in the elderly: symptomatic or asymptomatic? *Int J Antimicrob Agents*. 1999 May 1;11(3):265–8.
172. Amarsy R, Guéret D, Benmansour H, Flicoteaux R, Berçot B, Meunier F, *et al*. Determination of *Escherichia coli* phylogroups in elderly patients with urinary tract infection or asymptomatic bacteriuria. *Clin Microbiol Infect*. 2019 Jan 12;
173. Kjölvmark C, Tschernij E, Öberg J, Pålman LI, Linder A, Åkesson P. Distinguishing asymptomatic bacteriuria from urinary tract infection in the elderly – the use of urine levels of heparin-binding protein and interleukin-6. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016 Jun 1;85(2):243–8.
174. Johnson JR, Kuskowski MA, Gajewski A, Soto S, Horcajada JP, Anta D, *et al*. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J Infect Dis*. 2005 Jan 1;191(1):46–50.
175. Turret J, Denamur E. Population phylogenomics of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*. 2016 Jan 7;4(1).
176. Abraham S, Chapman TA, Zhang R, Chin J, Mabbett AN, Totsika M, *et al*. Molecular characterization of *Escherichia coli* strains that cause symptomatic and asymptomatic urinary tract infections. *J Clin Microbiol*. 2012 Mar;50(3):1027.
177. Jauréguy F, Carbonnelle E, Bonacorsi S, Clec'h C, Casassus P, Bingen E, *et al*. Host and bacterial determinants of initial severity and outcome of *Escherichia coli* sepsis. *Clin Microbiol Infect*. 2007 Sep 1;13(9):854–62.
178. Vejborg RM, Hancock V, Schembri MA, Klemm P. Comparative genomics of *Escherichia coli* strains causing urinary tract infections. *Appl Environ Microbiol*. 2011 May;77(10):3268–78.

179. Watts RE, Totsika M, Challinor VL, Mabbett AN, Ulett GC, Voss JJD, *et al.* Contribution of siderophore systems to growth and urinary tract colonization of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2012 Jan;80(1):333.
180. Mobley HLT. Measuring *Escherichia coli* gene expression during human urinary tract infections. *Pathogens.* 2016 Jan 15;5(1).
181. Brumbaugh AR, Smith SN, Subashchandrabose S, Himpfl 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 Apr 1;83(4):1443–50.
182. Snyder JA, Haugen BJ, Buckles EL, Lockatell CV, Johnson DE, Donnenberg MS, *et al.* Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infect Immun.* 2004 Nov 1;72(11):6373–81.
183. Ruiz J, Simon K, Horcajada JP, Velasco M, Barranco M, Roig G, *et al.* Differences in virulence factors among clinical isolates of *Escherichia coli* causing cystitis and pyelonephritis in women and prostatitis in men. *J Clin Microbiol.* 2002 Dec;40(12):4445–9.
184. Johnson JR, Owens K, Gajewski A, Kuskowski MA. Bacterial characteristics in relation to clinical source of *Escherichia coli* isolates from women with acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women. *J Clin Microbiol.* 2005 Dec;43(12):6064–72.
185. Tseng CC, Huang JJ, Wang MC, Wu AB, Ko WC, Chen WC, *et al.* PapG II adhesin in the establishment and persistence of *Escherichia coli* infection in mouse kidneys. *Kidney Int.* 2007 Apr 2;71(8):764–70.
186. Guyer DM, Radulovic S, Jones F-E, Mobley HLT. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infect Immun.* 2002 Aug 1;70(8):4539–46.
187. Hendrickson H. Order and disorder during *Escherichia coli* divergence. *PLoS Genet.* 2009 Jan;5(1):e1000335.
188. Raffatellu M. Learning from bacterial competition in the host to develop antimicrobials. *Nat Med.* 2018 Aug;24(8):1097–103.
189. Azpiroz MF, Poey ME, Laviña M. Microcins and urovirulence in *Escherichia coli*. *Microb Pathog.* 2009 Nov;47(5):274–80.
190. Šmajš D, Micenková L, Šmarda J, Vrba M, Ševčíková A, Vališová Z, *et al.* Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiol.* 2010 Nov 15;10:288.
191. Nielsen KL, Stegger M, Kiil K, Godfrey PA, Feldgarden M, Lilje B, *et al.* Whole-genome comparison of urinary pathogenic *Escherichia coli* and faecal isolates of UTI patients and healthy controls. *Int J Med Microbiol.* 2017 Sep 14;
192. Yamamoto S, Tsukamoto T, Terai A, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Genetic evidence supporting the fecal-perineal-urethral hypothesis in cystitis caused by *Escherichia coli*. *J Urol.* 1997 Mar;157(3):1127–9.
193. Moreno E, Andreu A, Pigrau C, Kuskowski MA, Johnson JR, Prats G. Relationship between *Escherichia coli* strains causing acute cystitis in women and the fecal *E. coli* population of the host. *J Clin Microbiol.* 2008 Aug 1;46(8):2529–34.

194. Li X-Z, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Apr 1;28(2):337–418.
195. Schalk IJ. Siderophore-antibiotic conjugates: exploiting iron uptake to deliver drugs into bacteria. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2018 Aug;24(8):801–2.
196. Portsmouth S, Veenhuizen D van, Echols R, Machida M, Ferreira JCA, Ariyasu M, *et al.* Cefiderocol versus imipenem-cilastatin for the treatment of complicated urinary tract infections caused by Gram-negative uropathogens: a phase 2, randomised, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis.* 2018 Dec 1;18(12):1319–28.
197. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis. *Pharm Ther.* 2015 Apr;40(4):277–83.
198. Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol.* 2013 Feb;11(2):95–105.
199. Yuzenkova J, Delgado M, Nechaev S, Savalia D, Epshtein V, Artsimovitch I, *et al.* Mutations of bacterial RNA polymerase leading to resistance to microcin J25. *J Biol Chem.* 2002 Dec 27;277(52):50867–75.
200. del Castillo FJ, del Castillo I, Moreno F. Construction and characterization of mutations at codon 751 of the *Escherichia coli gyrB* gene that confer resistance to the antimicrobial peptide microcin B17 and alter the activity of DNA gyrase. *J Bacteriol.* 2001 Mar;183(6):2137–40.
201. Delgado MA, Vincent PA, Farías RN, Salomón RA. Yo1j of *Escherichia coli* functions as a microcin J25 efflux pump. *J Bacteriol.* 2005 May;187(10):3465–70.
202. Naimi S, Zirah S, Hammami R, Fernandez B, Rebuffat S, Fliss I. Fate and biological activity of the antimicrobial lasso peptide microcin J25 under gastrointestinal tract conditions. *Front Microbiol.* 2018 Aug 3;9.
203. Wullt B, Svanborg C. Deliberate establishment of asymptomatic bacteriuria—a novel strategy to prevent recurrent UTI. *Pathogens.* 2016 Jul 29;5(3).
204. Morand A, Cornu F, Dufour J-C, Tsimaratos M, Lagier J-C, Raoult D. Human bacterial repertoire of the urinary tract: a potential paradigm shift. *J Clin Microbiol.* 2019 Mar 1;57(3):e00675-18.
205. Tariq R, Pardi DS, Tosh PK, Walker RC, Razonable RR, Khanna S. Fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection reduces recurrent urinary tract infection frequency. *Clin Infect Dis.* 2017 Oct 30;65(10):1745–7.
206. Birgy A, Levy C, Bidet P, Thollot F, Derkx V, Béchet S, *et al.* ESBL-producing *Escherichia coli* ST131 versus non-ST131: evolution and risk factors of carriage among French children in the community between 2010 and 2015. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Oct 1;71(10):2949–56.
207. Jolivet S, Vaillant L, Poncin T, Lolom I, Gaudonnet Y, Rondinaud E, *et al.* Prevalence of carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacteria and associated factors in a French hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Dec 1;24(12):1311–4.

**Clémence Massip**

Rôle de l'îlot génomique *pks* dans la synthèse des sidérophores-microcines chez *Escherichia coli*

## Résumé

Les sidérophores-microcines H47 et M (MccH47 et MccM) sont des peptides antimicrobiens hybrides, constitués d'une entité peptidique couplée à un groupement dérivé d'un sidérophore, l'entérobactine. Elles sont à l'origine de l'activité antagoniste de la souche *Escherichia coli* Nissle (EcN) vis-à-vis d'entérobactéries pathogènes. Cette souche est également porteuse de l'îlot *pks* à l'origine de la synthèse d'une génotoxine, la colibactine.

Nous avons déterminé que la peptidase ClbP codée par l'îlot *pks* était indispensable à la synthèse des sidérophores-microcines chez EcN. C'est la partie C-terminale ancrant ClbP dans la membrane interne qui permet la synthèse des MccH47 et MccM, et non son site catalytique essentiel à la maturation de la colibactine. Par rapport au système génétique conduisant à la synthèse des MccH47 et MccM chez les souches *E. coli* CA46 et CA58, l'îlot sidérophores-microcines de EcN est tronqué. Nous avons montré que IroB, impliqué dans la synthèse des salmochélines était indispensable à l'activité antagoniste de EcN, probablement en assurant le rôle de son homologue McmL manquant chez EcN. Nous avons déterminé que l'ensemble des souches séquencées de *E. coli* portant un îlot microcines tronqué possédait les îlots *pks* et salmochélines, ce qui renforce l'hypothèse d'une interdépendance et d'une coévolution de ces systèmes.

Nous avons étudié la présence des îlots microcines, *pks* et salmochélines dans une collection de souches de *E. coli* responsables de pyélonéphrites, cystites ou bactériuries asymptomatiques. L'analyse génétique de plus de 200 souches recueillies à la suite d'examens cyto bactériologiques des urines a permis de confirmer l'association systématique de ces 3 îlots. La proportion des souches productrices de MccH47 et MccM est identique quel que soit le tableau clinique, ce qui tendrait à prouver qu'il s'agit davantage d'un facteur permettant la colonisation de l'arbre urinaire à partir de la niche intestinale plutôt que d'un facteur de virulence dans le tractus urinaire.

**Mots clés :** *E. coli*, sidérophores-microcines, îlot *pks*, colibactine, souches uropathogènes

## Summary

Siderophore-microcins H47 and M (MccH47 and MccM) are antimicrobial peptides, built from a peptidic precursor modified with a siderophore enterobactin derived moiety. They are responsible for *Escherichia coli* strain Nissle (EcN) antagonistic activity against pathogenic enterobacteria. EcN also carries the *pks* island encoding the genotoxin colibactin production.

We determined that the *pks* island encoded peptidase ClbP was necessary for siderophore-microcins synthesis in EcN. ClbP catalytic site, which is involved in colibactin maturation, plays no role in EcN antagonistic activity, whereas its C-terminal domain, which anchors ClbP to the inner membrane is required. EcN microcin gene cluster is truncated in comparison to *E. coli* strains CA46 or CA58 microcin gene clusters. We showed that IroB, which is involved in salmochelin synthesis is required for EcN antagonistic activity. It probably replaces its homolog McmL lacking in EcN. We determined that all *E. coli* strains bearing a truncated microcin gene cluster also carried the *pks* island and the salmochelin gene cluster. It reinforces the hypothesis of an interplay and a coevolution of these systems.

We studied the presence of the microcin, the *pks*, and the salmochelin gene cluster in a collection of *E. coli* strains responsible for pyelonephritis, cystitis, or asymptomatic bacteriuria. The genetic analysis of more than 200 strains collected after cyto bacteriological examinations of urine confirmed the systematic association between these three gene clusters. The proportion of strains producing MccH47 and MccM is identical whatever the clinical presentation, which tends to prove that they are not virulence factors *per se*, but that they may favor the colonization of the urinary tract from the intestinal niche.

**Keywords:** *E. coli*, siderophore-microcines, *pks* island, colibactin, uropathogenic strains