

Université de Paris

**École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (ED 562)**  
**Infection, Antimicrobiens, Modélisation, Évolution (IAME)**  
UMR1137, INSERM, Université de Paris

Étude comparative du clade émergent de  
*Escherichia coli* ST131 O25b:H4 et de son  
clade progéniteur : fitness *in vitro* et *in vivo*  
et formation de biofilm

par

**Marion Duprilot**

Thèse de doctorat de microbiologie  
Dirigée par Marie-Hélène Nicolas-Chanoine

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 15 Octobre 2019

Président du jury : Pr STÉPHANE BONACORSI, INSERM, Université de Paris, Hôpital Robert-Debré  
Rapporteurs : Pr CHRISTIANE FORESTIER, CNRS, Université Clermont Auvergne  
Pr XAVIER BERTRAND, CNRS, Université de Franche-Comté  
Examineurs : Dr MARISA HAENNI, ANSES, Université Claude Bernard (Lyon I)  
Pr GUILLAUME ARLET, INSERM, Sorbonne Université  
Directeur de thèse : Pr MARIE-HÉLÈNE NICOLAS-CHANOINE, INSERM, Université de Paris





**Titre : Étude comparative du clade émergent de *Escherichia coli* ST131 O25b:H4 et de son clade progéniteur : fitness *in vitro* et *in vivo* et formation de biofilm**

**Résumé:** Le clade C de *Escherichia coli* ST131, pathogène extra-intestinal (ExPEC) multirésistant aux antibiotiques, a émergé dans le monde entier au début des années 2000. La compréhension de son essor fait partie des enjeux majeurs de santé publique. Pour participer à cette compréhension, nous avons pris en considération l'histoire phylogénique de ST131 et axé nos recherches sur la comparaison du clade C avec son progéniteur, le clade B, qui est lui composé de souches globalement sensibles aux antibiotiques.

L'histoire phylogénétique du clone ST131 décrit la diversification du clade B ancestral en différents sous-clades B (de B1 à B5), B5 donnant naissance au clade C, qui lui-même s'est diversifié en deux sous-clades, C1 et C2. Nous avons souhaité connaître l'évolution de ces différents sous-clades en termes de fréquence relative au sein de tous les ExPEC. Pour cela, nous avons analysé les génomes de ST131 identifiés au sein de *E. coli* bactériémiques systématiquement collectés en Angleterre entre 2001 et 2012. Cette analyse a montré que, durant la période étudiée, (i) ST131 faisait partie des quelques clones dominants, avec en son sein une dominance des souches de clade C, en particulier celles de sous-clade C2 et (ii) les souches de clade B persistaient de manière stable, en particulier celles de sous-clades B4 et B5, malgré une fréquence relative globale plus faible que celle du clade C. Par ailleurs, nous avons constitué une collection de 39 souches ST131 qui se sont avérées représentatives de la diversité des clades et sous-clades B et C, à l'exception d'une souche B4 (nommée Hybride), porteuse de l'allèle *fimH30*, normalement spécifique du clade C. Grâce à cette collection, nous avons exploré la croissance et la formation de biofilm précoce (après 2, 3 et 5 h d'incubation) des souches de clade B et C. Toutes les souches possédaient des capacités de croissance égales, alors qu'elles différaient quant à la formation de biofilm : biofilm plus fréquemment observé en 2 h chez le clade B que chez le clade C.

Puis, deux souches représentatives du clade B et du clade C, nommées Ancêtre et Émergente, respectivement, ainsi que Hybride ont été soumises à des compétitions deux à deux *in vitro* et *in vivo* (dans divers modèles murins). En dépit de l'absence de différences de fitness *in vitro* entre ces trois souches, Émergente s'est montrée chez la souris moins bonne colonisatrice des tractus intestinaux et/ou urinaires et moins virulente dans le modèle de septicémie que Ancêtre et Hybride. Faisant référence au gène *fimB* non fonctionnel chez toutes les souches de clade C, gène codant un des régulateurs de la synthèse des fimbriae de type 1 qui participent à la formation du biofilm et à l'adhésion bactérienne, nous l'avons délété chez Ancêtre et Hybride. Bien que la délétion du gène *fimB* abolissait *in vitro* la formation du biofilm précoce observée chez les souches parentales, aucun effet n'a été observé lors de la mise en compétition des mutants avec leurs souches parentales, *in vitro* comme *in vivo* ; mutant et souche parentale se comportaient de manière équivalente au regard de la colonisation intestinale et de la virulence chez la souris.

Au total, ces travaux suggèrent qu'une perte de virulence globale, processus connu pour améliorer le niveau de transmission bactérien, est survenue chez le clade C de ST131 en plus de son acquisition d'une multirésistance aux antibiotiques, deux évolutions susceptibles de lui assurer un meilleur fitness, notamment dans les environnements sous pression antibiotique.

**Mots clefs :** *Escherichia coli* ST131, clone émergent, clade et sous-clade B et C, multirésistance aux antibiotiques, fitness, virulence, biofilm, modèles animaux, évolution



**Title: Comparative study of the emerging *Escherichia coli* ST131 O25b:H4 clade and its progenitor clade: *in vitro* and *in vivo* fitness and biofilm formation**

**Abstract:** The clade C of *Escherichia coli* ST131, an extra-intestinal pathogen (ExPEC) multidrug-resistant, emerged worldwide in the early 2000s. Understanding its expansion is one of the major public health challenges. To contribute to this understanding, we took into consideration the phylogenesis of ST131 and focused our research on comparing the clade C with its progenitor, the clade B, which is composed of strains globally sensitive to antibiotics.

The phylogenesis of the clone ST131 describes the diversification of the ancestral clade B into different B subclades (from B1 to B5), B5 giving rise to clade C, which itself has diversified into two subclades, C1 and C2. We wanted to learn about the evolution of these different subclades in terms of relative frequency within all ExPECs. For this purpose, we analyzed the ST131 genomes identified within bacteriemic *E. coli* systematically collected in England between 2001 and 2012. This analysis showed that, during the studied period, (i) ST131 was one of the few dominant clones, with a dominance of clade C strains, particularly those of subclade C2 and (ii) clade B strains persisted in a stable manner, particularly those of subclades B4 and B5, despite an overall relative frequency lower than that of clade C. Besides, we have compiled a collection of 39 ST131 strains that have been found to be representative of the diversity of B and C clades and subclades, with the exception of one B4 strain (called Hybrid), which carries the *fimH30* allele, normally specific to the clade C. Through this collection, we have explored the growth and formation of early biofilm (after 2, 3 and 5 hours of incubation) of clade B and C strains. All strains had equal growth capacities, while they differed in biofilm formation: biofilm was more frequently observed in 2 h in clade B strains than in clade C strains.

Then, two representative strains of clades B and C, called Ancestor and Emergent, respectively, as well as Hybrid, were subjected to competitions two by two *in vitro* and *in vivo* (in various mouse models). Despite the absence of *in vitro* fitness differences between these three strains, Emergent was found to be less effective in colonizing the intestinal and/or urinary tract in mice and less virulent in the sepsis model than Ancestor and Hybrid. Referring to the non-functional *fimB* gene in all strains of clade C, a gene encoding one of the regulators of type 1 fimbriae synthesis involved in biofilm formation and bacterial adhesion, we have deleted it in Ancestor and Hybrid. Although the deletion of the *fimB* gene abolished *in vitro* the formation of early biofilm observed in parental strains, no effect was observed when mutants were put in competition with their parental strains, *in vitro* and *in vivo*; mutant and parental strain also behaved equally with regard to intestinal colonization and virulence in mice.

In total, this work suggests that a global loss of virulence, a process known to improve the level of bacterial transmission, has occurred in ST131 clade C in addition to its acquisition of a multidrug resistance, two evolutions likely to ensure better fitness, especially in environments under antibiotic pressure.

**Keywords:** *Escherichia coli* ST131, emerging clone, B and C clades and subclades, multidrug resistance, fitness, virulence, biofilm, animal model, evolution



## Remerciements

Merci aux membres du jury de me faire l'honneur de juger ce travail :

À Christiane Forestier et Xavier Bertrand, d'avoir accepté d'en être les rapporteurs, en particulier à Christiane, dont les passionnants enseignements ont semé en moi la graine de la bactériologie, À Marisa Haenni, Guillaume Arlet et Stéphane Bonacorsi, d'avoir accepté d'en être les examinateurs, en particulier à Guillaume Arlet, auprès de qui j'ai appris la curiosité scientifique, fondamentale dans l'exercice de la recherche.

Je remercie également Marie-Hélène Nicolas-Chanoine, pour tout le savoir et la rigueur que vous m'avez transmis, ainsi que pour votre grande disponibilité et votre encadrement de qualité exemplaire.

À Erick, merci infiniment pour toute l'attention, l'intérêt et la bienveillance que vous apportez au quotidien à vos étudiants.

Je voudrais bien sûr remercier toutes les personnes de l'unité de recherche IAME, avec qui j'ai pu travailler, échanger, partager et rire au cours de ces 4 années. Merci avant tout à l'entité, unité merveilleuse : MÉRIL, Marine et Anne-Claire, merci de m'avoir acceptée, intégrée et merci pour tous ces moments d'amitié, de soutien, de rires, de déprime parfois, voire de peur (mais jamais plus d'1 heure) partagés ensemble au cours de ces belles années. Merci à Momo pour ton rire, à Antoine pour ton éternelle bonne humeur, à Mélanie pour ton aide précieuse et ton sourire, à Guilhem pour les séances de lolottes et zipettes partagées, à Françoise, notre maman à tous, à André pour ton sourire et ton apaisante bienveillance, à Hervé, élu meilleur MCU-PH de l'univers, à François pour nos enrichissantes discussions scientifiques, à Camille pour ton humour dévastateur, à Violaine, swingueuse en chef, à Manu pour ton humour légendaire et ta bonne humeur inébranlable, à Maud, best teammate ever, à Alexandra la botaniste pour ton aide, à Benoit pour tes mises à jour thug, à Alaksh pour ton infinie gentillesse.

Un grand merci à mes collègues de l'Hôpital Beaujon : à Véronique et Frédéric, j'ai énormément appris auprès de vous, ce fût un plaisir de travailler à vos côtés, tant humainement que professionnellement, à Naouale, co-bureau et collègue idéale, merci pour ton écoute et ton incroyable gentillesse, à Noémie, super co-bureau, merci pour ton aide et ta sympathie, et à toute l'équipe de Microbiologie et celle de Médecine Interne.

À mes amis parisiens, Marine, phare dans la grisaille parisienne, Gauthier, doux précieux, Charles, Nabih et Fatou, merci pour tous ces joyeux moments passés ensemble, Aurore, meilleure co-M2 du monde, Maïté, Gui Bat, Tiffany, Rouflaquettes, Mukaddas, Kristel, Quentin, Mélanie, et tous ceux qui ont croisé mon chemin et l'ont rendu toujours plus agréable au cours de ces années. À mes amis de Clermont-Ferrand et d'ailleurs, promis, cette fois les études, c'est fini !

Un immense merci à ma famille, merci pour votre écoute, votre amour et votre soutien sans borne.

Enfin, à Romain, mon anagramme, merci pour ton calme, ton optimisme à toute épreuve, ton écoute, ton entrain et tes sourires, qui illuminent ma vie malgré la distance, et sans lesquels je n'aurais su endurer les périodes difficiles et exigeantes de ces années.





# Table des matières

REMERCIEMENTS	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES TABLEAUX	xi
INTRODUCTION	xiii
<b>1 ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>1</b>
I. <i>Escherichia coli</i> : du commensal au pathogène multi-résistant aux antibiotiques	2
I.1. Diversité au sein de l'espèce <i>E. coli</i>	2
I.2. <i>E. coli</i> : du commensalisme à la pathogénicité	7
I.3. <i>E. coli</i> et résistance aux antibiotiques : un problème de santé publique	11
II. <i>Escherichia coli</i> ST131	13
II.1. Prémisses et découverte d'un clone émergent	13
II.2. Qui est <i>E. coli</i> ST131 et d'où vient-il ? Caractérisation d'un clone émergent	15
II.3. Epidémiologie de <i>E. coli</i> ST131	27
III. Les clefs du succès du clade C du clone O25b:H4 ST131	47
III.1. Fitness et <i>E. coli</i> ST131	48
III.2. Capacité de colonisation de ST131	56
<b>2 ÉTUDES EXPÉRIMENTALES</b>	<b>67</b>
I. Problématiques et objectifs	68
II. Étude préliminaire (travaux participatifs)	70
II.1. Contexte	70
II.2. Méthodes	70
II.3. Résultats	71
II.4. Conclusion	71
II.5. Participation personnelle à cette étude	72
II.6. Article	72
III. Travaux personnels	93
III.1. Introduction	93
III.2. Article	94
<b>3 DISCUSSION</b>	<b>159</b>
<b>PERSPECTIVES</b>	<b>171</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>173</b>
<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>175</b>

# Liste des figures

1	Histoire phylogénétique de <i>Escherichia coli</i> , d'après Gordon <i>et al.</i> <sup>18</sup> . . .	4
2	Arbre phylogénétique du groupe B2, adapté de Le Gall <i>et al.</i> <sup>21</sup> . . . . .	6
3	Distribution des isolats sensibles ou résistants aux fluoroquinolones (FQ) parmi les sept sous-clones de ST131 basés sur l'allèle <i>fimH</i> (H), d'après Johnson <i>et al.</i> <sup>73</sup> . . . . .	16
4	Les allèles des gènes <i>gyrA</i> et <i>parC</i> associés à <i>E. coli</i> ST131 : phylogénie des gènes et combinaisons, d'après Johnson <i>et al.</i> <sup>73</sup> . . . . .	17
5	Scénario évolutif de l'émergence des clades B et C de ST131, d'après Ben Zakour <i>et al.</i> <sup>78</sup> . . . . .	19
6	Proposition d'événements menant à l'apparition de plasmides circulant actuellement chez ST131, adapté de Johnson <i>et al.</i> <sup>80</sup> . . . . .	24
7	Paramètres contribuant au pool de la résistance antimicrobienne et à la transmission de bacilles à Gram négatif multi-résistants chez les humains, les animaux, les aliments et l'environnement, adapté de Seiffert <i>et al.</i> <sup>114</sup> . . .	28
8	Dissémination globale de <i>E. coli</i> ST131 en 2013, Nicolas-Chanoine <i>et al.</i> <sup>22</sup>	29
9	Proportions de STs au cours des 11 ans d'échantillonnage systématique des <i>E. coli</i> isolés de bactériémies, d'après Kallonen <i>et al.</i> <sup>133</sup> . . . . .	51
10	Les différentes étapes de formation d'un biofilm de <i>E. coli</i> , adaptée de Lebeaux <i>et al.</i> <sup>297</sup> . . . . .	57
11	Représentation schématique du fimbriae de type 1 de <i>E. coli</i> , d'après Mydock-McGrane LK <i>et al.</i> <sup>310</sup> . . . . .	59
12	Schéma du mécanisme de la variation de phase de l'opéron <i>fim</i> , d'après C. Sakamoto <sup>300</sup> . . . . .	60
13	Pathogénèse d'une infection urinaire causée par un <i>E. coli</i> uropathogène (UPEC), d'après Kaper <i>et al.</i> <sup>31</sup> . . . . .	65
14	Dynamique évolutive de la virulence dans un contexte écologique donné, d'après Diard <i>et al.</i> <sup>263</sup> . . . . .	168

<sup>18</sup> D. M. Gordon *et al.*, *Environmental Microbiology*, **10**: 2484–2496, 2008.

<sup>21</sup> T. Le Gall *et al.*, *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 2373–2384, 2007.

<sup>73</sup> J. R. Johnson *et al.*, *The Journal of Infectious Diseases*, **207**: 919–928, 2013.

<sup>73</sup> J. R. Johnson *et al.*, *The Journal of Infectious Diseases*, **207**: 919–928, 2013.

<sup>78</sup> N. L. Ben Zakour *et al.*, *mBio*, **7**: , 2016.

<sup>80</sup> T. J. Johnson *et al.*, *mSphere*, **1**: , 2016.

<sup>114</sup> S. N. Seiffert *et al.*, *Drug Resistance Updates*, **16**: 22–45, 2013.

<sup>22</sup> M.-H. Nicolas-Chanoine *et al.*, *Clinical Microbiology Reviews*, **27**: 543–574, 2014.

<sup>133</sup> T. Kallonen *et al.*, *Genome Research*, **27**: 1437–1449, 2017.

<sup>297</sup> D. Lebeaux *et al.*, *Microbiology and molecular biology reviews*, **78**: 510–543, 2014.

<sup>310</sup> L. K. Mydock-McGrane *et al.*, *Expert opinion on drug discovery*, **12**: 711–731, 2017.

<sup>300</sup> C. Sakamoto., PhD thesis, Paris 7, 2013.

<sup>31</sup> J. B. Kaper *et al.*, *Nature Reviews Microbiology*, **2**: 123, 2004.

<sup>263</sup> M. Diard *et al.*, *FEMS microbiology reviews*, **41**: 679–697, 2017.

# Liste des tableaux

1	Les différents virotypes de <i>E. coli</i> ST131 et les gènes les définissant, d'après Dahbi <i>et al.</i> <sup>208</sup> . . . . .	54
2	Bilan des compétitions entre les trois souches sélectionnées : Ancêtre (A), Émergente (E) et Hybride (H), et leurs éventuels mutants $\Delta fimB$ ( $\Delta$ ) . . . . .	164

---

<sup>208</sup> G. Dahbi *et al.*, International journal of medical microbiology, **304**: 1247–1257, 2014.



# Introduction

---

À travers le monde, les *Escherichia coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) sont considérés comme des pathogènes humains majeurs. Les ExPEC font en effet partie des bactéries les plus fréquemment associées à un sepsis et sont responsables de la majorité des infections urinaires mondiales. Le microbiote intestinal de l'Homme et des animaux est le principal réservoir des ExPEC, à partir duquel ils essaient et provoquent des infections extra-intestinales, à la fois en milieu hospitalier et dans la communauté. Avant les années 2000, les ExPEC étaient en grande majorité sensibles aux antibiotiques de première ligne, comme les fluoroquinolones ou les céphalosporines, mais en 2014, un rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) alertait sur la prévalence grandissante de la résistance aux fluoroquinolones parmi les souches de *E. coli*, famille d'antibiotiques la plus largement utilisée à travers le monde dans le traitement des infections urinaires. Plus récemment, l'OMS a classé les *E. coli* producteurs de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE), et donc résistants aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G), comme agents pathogènes critiques au sein de la première liste des agents pathogènes prioritaires résistants aux antibiotiques.

Seul un nombre limité de clones sont tenus responsables de la majorité des infections à ExPEC. Le clone *E. coli* sequence type (ST) 131, principalement représenté par des souches clonales résistantes aux fluoroquinolones, voire productrices de BLSE, est prédominant au sein de ExPEC depuis les années 2000. Répandu dans le monde entier, ce clone est majoritairement responsable de la pandémie causant des millions d'infections résistantes aux antibiotiques chaque année, ce qui en fait un problème mondial majeur de santé publique. Les études de génétiques de populations indiquent que le ST131 est composé de trois clades A, B et C, chacun doté d'un allèle du gène *fmH* spécifique : *H41*, *H22* et *H30*, respectivement, le sous-clone émergent multirésistant appartenant au clade C. L'avènement des nouvelles techniques de séquençage haut débit a permis d'établir l'histoire évolutive de ce clone : le clade B, progéniteur du clade C, présidait parmi les ST131 avant les années 1990, puis le clade C est devenu le clade dominant depuis les années 2000.

La structure de la population de *E. coli* ST131 a été explorée de manière exhaustive, mais rares sont les études s'intéressant aux mécanismes ayant permis le succès mondial de ce clone. La question des facteurs impliqués dans l'émergence de *E. coli* ST131 reste donc entière et y apporter des réponses est un enjeu majeur, tant pour enrayer la pandémie actuelle de *E. coli* ST131, que pour anticiper et prévenir l'émergence du prochain clone ExPEC multirésistant aux antibiotiques.

L'objectif de ce travail de thèse est d'aborder la problématique de l'émergence du clade C du clone ST131 par une approche phénotypique, en comparant les souches émergentes du clade C à leurs souches progénitrices du clade B.

Nous présentons dans un premier temps l'état de l'art concernant l'espèce *E. coli*, et en particulier le ST131, puis nous explorons quelques facteurs potentiellement responsables de sa réussite mondiale. Dans un deuxième temps, nous exposons un travail préliminaire étudiant la cinétique de production de biofilm précoce au sein d'une large collection de *E. coli*, suivi de nos travaux personnels menés dans le cadre de cette thèse, portant sur l'étude de l'émergence du clade C de ST131 axée sur la comparaison phénotypique et la mise en compétition de souches de clade B et de clade C dans différents modèles *in vitro* et *in vivo*. Enfin, nous commentons les différents résultats au regard des données de la littérature, afin de discuter leur robustesse et leur originalité et d'établir des perspectives de recherches futures.





# Étude bibliographique

---

<b>I. <i>Escherichia coli</i> : du commensal au pathogène multi-résistant aux antibiotiques</b> . . . . .	<b>2</b>
<b>I.1. Diversité au sein de l'espèce <i>E. coli</i></b> . . . . .	<b>2</b>
A. Sérotypage . . . . .	2
B. Groupes phylogénétiques . . . . .	3
C. Diversité au sein du groupe phylogénétique B2 . . . . .	4
<b>I.2. <i>E. coli</i> : du commensalisme à la pathogénicité</b> . . . . .	<b>7</b>
<b>I.3. <i>E. coli</i> et résistance aux antibiotiques : un problème de santé publique</b> . . . . .	<b>11</b>
<b>II. <i>Escherichia coli</i> ST131</b> . . . . .	<b>13</b>
<b>II.1. Prémisses et découverte d'un clone émergent</b> . . . . .	<b>13</b>
<b>II.2. Qui est <i>E. coli</i> ST131 et d'où vient-il ? Caractérisation d'un clone émergent</b> . . . . .	<b>15</b>
A. Méthodes de typage et caractérisation . . . . .	15
B. Histoire évolutive de <i>E. coli</i> ST131 à la lumière du séquençage de génome complet . . . . .	18
C. <i>E. coli</i> ST131 et plasmides . . . . .	21
<b>II.3. Epidémiologie de <i>E. coli</i> ST131</b> . . . . .	<b>27</b>
A. Epidémiologie humaine de ST131 . . . . .	28
B. ST131 et les animaux de compagnie . . . . .	39
C. ST131, animaux d'élevage et aliments . . . . .	41
D. ST131 et les animaux sauvages . . . . .	44
E. ST131 et l'environnement . . . . .	45
<b>III. Les clefs du succès du clade C du clone O25b:H4 ST131</b> . . . . .	<b>47</b>
<b>III.1. Fitness et <i>E. coli</i> ST131</b> . . . . .	<b>48</b>
A. Méthodes de mesure du fitness . . . . .	48
B. Fitness et résistance . . . . .	49
C. Fitness et virulence . . . . .	52
<b>III.2. Capacité de colonisation de ST131</b> . . . . .	<b>56</b>
A. Production de biofilm et ST131 . . . . .	56
B. Colonisation du tractus intestinal par ST131 . . . . .	62
C. Colonisation de l'arbre urinaire par ST131 . . . . .	64

# I. *Escherichia coli* : du commensal au pathogène multi-résistant aux antibiotiques

## I.1. Diversité au sein de l'espèce *E. coli*

L'espèce *E. coli* appartient au genre *Escherichia*, à la famille des Entérobactéries et à la classe des  $\gamma$ -Protéobactéries. Historiquement, la définition d'espèce englobait des caractères phénotypiques et morphologiques, comme l'aspect à la coloration de Gram, les caractéristiques respiratoires, le métabolisme des sucres, etc<sup>1</sup>. Puis les espèces du genre *Escherichia* ont pu être caractérisées selon des caractères génétiques : initialement par technique d'hybridation de l'ADN, où deux souches appartenaient à la même espèce si plus de 70% de leur ADN s'hybridait ensemble<sup>2</sup>, résultats qui ont été confirmés par la suite lors du développement de techniques moléculaires comme le multilocus enzyme electrophoresis (MLEE)<sup>3</sup>, le random amplified polymorphic DNA (RAPD)<sup>4</sup> et le multilocus sequence typing (MLST)<sup>5</sup>.

Depuis la première description de l'espèce *E. coli* par Castellani et Chalmers en 1918<sup>6</sup>, cette espèce, du fait de sa dualité entre commensalisme et pathogénicité, sa facilité de manipulation en laboratoire et sa plasticité génétique, a été grandement étudiée, en particulier la souche de référence *E. coli* K-12. *E. coli* présente une infrastructure phylogénétique étendue dont la connaissance a été affinée au fil des ans grâce aux nombreuses avancées techniques.

### A. Sérotypage

La structure clonale de la population de *E. coli* fut d'abord supportée par l'analyse des sérotypes, méthode développée en 1940 par Kauffman<sup>7</sup>. Cette technique se base sur l'étude de 173 antigènes somatiques O, 80 antigènes capsulaires K et 56 antigènes flagellaires H, dont la combinaison définit un grand nombre de sérotypes<sup>8</sup>. Comme la fréquence relative de nombreux antigènes

<sup>1</sup> P. H. A. Sneath *et al.*, *Nature*, **193**: 855–860, 1962.

<sup>2</sup> D. J. Brenner *et al.*, *Journal of Bacteriology*, **109**: 953–965, 1972.

<sup>3</sup> R. K. Selander *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, **51**: 873–884, 1986.

<sup>4</sup> P. Desjardins *et al.*, *Journal of Molecular Evolution*, **41**: 440–448, 1995.

<sup>5</sup> T. Wirth *et al.*, *Molecular Microbiology*, **60**: 1136–1151, 2006.

<sup>6</sup> A. Castellani *et al.* *Manual of tropical medicine*. New York : William Wood, 1919.

<sup>7</sup> F. Kauffmann., *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **57**: 71–100, 1947.

<sup>8</sup> F. Orskov *et al.*, *Canadian Journal of Microbiology*, **38**: 699–704, 1992.

variait avec la source de l'isolat bactérien, mais qu'à l'inverse, les antigènes O, K et H n'étaient pas associés de manière aléatoire, l'idée de l'existence de lignées stables, appelées clones, dans la population de *E. coli* a émergé<sup>9</sup>.

## B. Groupes phylogénétiques

Dans les années 80 a été développé le MLEE, caractérisant les isolats au regard de la mobilité électrophorétique relative d'enzymes bactériennes dites de ménage<sup>3</sup>. Cette technique révéla qu'il existait un faible nombre de phénotypes distincts, et que des clones issus d'hôtes différents non liés épidémiologiquement (sans liens temporel ni géographique) pouvaient être identiques<sup>9</sup>. Un panel de 72 souches, la collection de référence de *E. coli* nommée ECOR, fût constitué en 1984 à partir d'isolats provenant de localisations géographiques variées et d'origines diverses (fèces d'humains, fèces d'animaux de zoo et infections urinaires humaines)<sup>10</sup>. Ces souches ont été choisies sur la base de leurs différences de « phénogrammes » MLEE et se sont trouvées par la suite être réellement représentatives de la diversité de l'espèce *E. coli*.

À partir de « phénogrammes » MLEE de la collection ECOR utilisant 35 enzymes, puis de la concaténation des différents gènes utilisés dans la technique du MLST appliquée à un plus grand nombre de souches, quatre groupes phylogénétiques furent distingués : A, B1, B2, D<sup>5,11</sup>. La distinction des groupes C et E fût établie plus tardivement<sup>9,12</sup>. L'existence de ces six groupes a été par la suite confirmée par différentes techniques, la dernière en date étant le séquençage de génome entier<sup>13</sup>, qui a, d'autre part, permis l'identification récente de deux nouveaux groupes phylogénétiques : F et G<sup>14,15</sup>. Cette classification phylogénétique a permis l'élaboration d'une phylogénie robuste (Figure 1), dans laquelle les groupes les plus basaux sont B2, F et D, suivis du groupe E puis des groupes A et B1, ces deux derniers étant ceux qui ont le plus récemment divergé<sup>16</sup>. Le groupe G est un groupe intermédiaire qui se place entre les groupes B2 et F<sup>15</sup>. Pour affilier des souches à ces groupes phylogénétiques, la technique du MLST peut être employée, mais la PCR

---

<sup>9</sup> O. Tenaillon *et al.*, *Nature Reviews Microbiology*, **8**: 207–217, 2010.

<sup>10</sup> H. Ochman *et al.*, *Journal of Bacteriology*, **157**: 690–693, 1984.

<sup>11</sup> R. K. Selander *et al.*, *Microbial Pathogenesis*, **3**: 1–7, 1987.

<sup>12</sup> O. Clermont *et al.*, *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, **11**: 654–662, 2011.

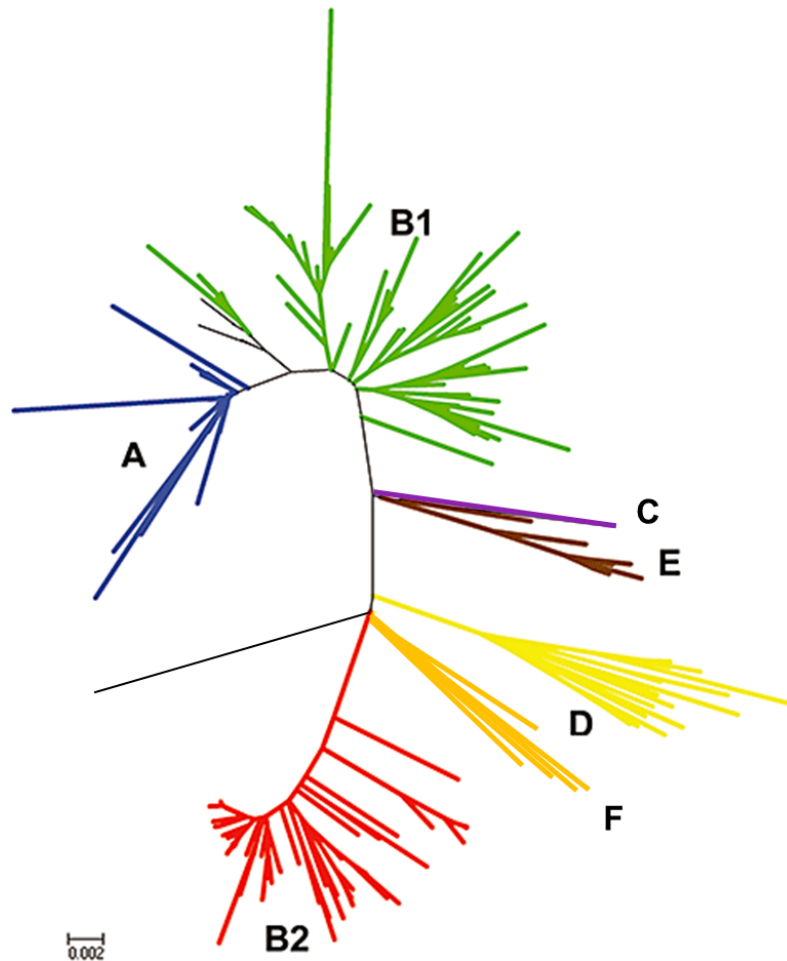
<sup>13</sup> M. Touchon *et al.*, *PLOS Genetics*, **5**: e1000344, 2009.

<sup>14</sup> B. Vangchhia *et al.*, *Microbiology (Reading, England)*, **162**: 1904–1912, 2016.

<sup>15</sup> O. Clermont *et al.*, *Environmental Microbiology*, **21**: 3107–3117, 2019.

<sup>16</sup> J. Beghain *et al.*, *Microbial Genomics*, **4**: , 2018.

quadruplex Clermont, basée sur l'amplification des gènes *arpA*, *chuA*, *yjaA* et du fragment d'ADN TspE4.C2, est la plus utilisée. La méthode Clermont a récemment été développée *in silico*<sup>16,17</sup>.



**Figure 1. Histoire phylogénétique de *Escherichia coli*, d'après Gordon *et al.*<sup>18</sup>.** Analyse phylogénétique construite par la méthode du plus proche voisin (« neighbor joining ») à partir du MLST de six gènes. L'arbre est raciné sur *Escherichia fergusonii*. Les couleurs indiquent les groupes phylogénétiques.

### C. Diversité au sein du groupe phylogénétique B2

La phylogénie des espèces est liée au mode de vie des souches : les groupes les plus ancestraux (B2, G, F et D) comprennent la majorité des ExPEC, alors que les souches de *E. coli* responsables de pathologies intestinales (InPEC) aiguës et sévères, comme le syndrome hémolytique et urémique (SHU), appartiennent aux groupes ayant divergé plus récemment<sup>19,20</sup>. Nous nous intéresserons plus particulièrement à la diversité des souches B2.

<sup>17</sup> O. Clermont *et al.*, Environmental microbiology reports, 5: 58–65, 2013.

<sup>19</sup> B. Picard *et al.*, Infection and Immunity, 67: 546–553, 1999.

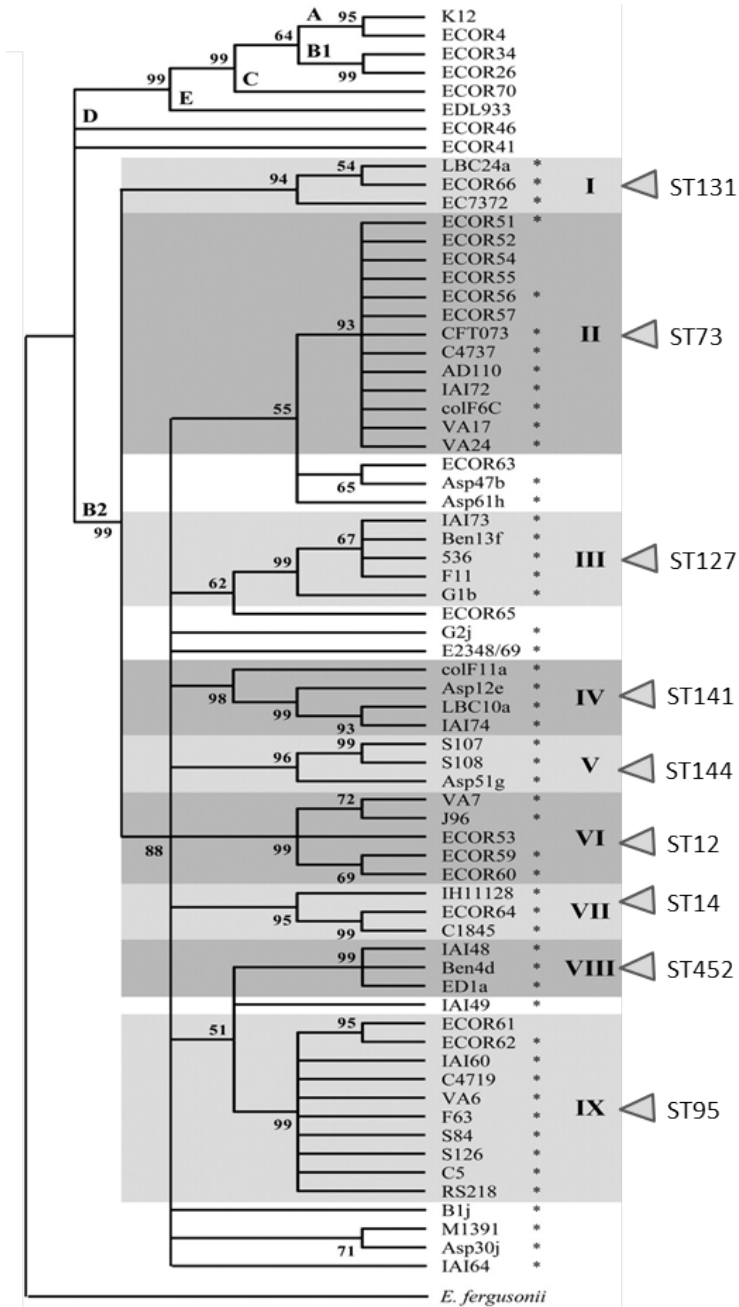
<sup>20</sup> P. Escobar-Páramo *et al.*, Molecular Biology and Evolution, 21: 1085–1094, 2004.

Neuf sous-groupes notés de I à IX ont été distingués au sein des B2 au cours d'une analyse par MLST de 60 souches de diverses origines écologiques et géographiques<sup>21</sup> (Figure 2). Ces sous-groupes sont également identifiés par le ST issu du MLST d'Achtman (7 loci ciblés)<sup>5</sup>. Au sein de cette classification, le sous-groupe I se compose de souches d'origines humaine et animale isolées d'infections urinaires ou de fèces incluant les souches du ST131, clone multirésistant aux antibiotiques ayant émergé dans le monde entier depuis le début des années 2000<sup>22</sup>. Le sous-groupe II est principalement composé de souches d'origine humaine, isolées d'infections urinaires, de bactériémie ou de fèces, et correspond au ST73. Le sous-groupe IX est le sous-groupe ayant divergé le plus récemment, composé de souches d'origine strictement humaine, isolées principalement de méningites néonatales, mais aussi d'infections urinaires, de bactériémies ou de fèces, et correspond au ST95. Par ailleurs, sur le plan de la virulence, les souches B2 sont majoritairement virulentes lorsqu'elles sont testées dans un modèle de septicémie chez la souris, en particulier les souches du sous-groupe I, sous-groupe le plus ancestral<sup>19,21</sup>.

---

<sup>21</sup> T. Le Gall *et al.*, *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 2373–2384, 2007.

<sup>22</sup> M.-H. Nicolas-Chanoine *et al.*, *Clinical Microbiology Reviews*, **27**: 543–574, 2014.



**Figure 2. Arbre phylogénétique du groupe B2, adapté de Le Gall *et al.*<sup>21</sup>.** Cet arbre, raciné sur *Escherichia fergusonii*, montre la distinction de neuf sous-groupes (I-IX) au sein du groupe phylogénétique B2. Les sequence type (ST) du schéma d'Achtman correspondants sont indiqués par une flèche.

## I.2. *E. coli* : du commensalisme à la pathogénicité

Les intestins et les fèces des animaux à sang chaud et des reptiles sont les réservoirs principaux de *E. coli*, microorganisme aérobie prédominant au sein d'une flore constituée en grande majorité de bactéries anaérobies (ratio de 1 *E. coli* pour 1000 anaérobies environ)<sup>9</sup>. Cet habitat intestinal fait de *E. coli* une bactérie commensale. Plus de 90% des humains portent des *E. coli* dans l'intestin, contre seulement 56% des animaux sauvages, 23% des oiseaux et 10% des reptiles<sup>23,24</sup>. Les souches commensales de *E. coli* résident préférentiellement dans le caecum et le colon, au sein de la couche de mucus qui recouvre les cellules épithéliales<sup>25</sup>. Elles peuvent être ensuite rejetées dans le lumen et sécrétées avec les produits de dégradation du mucus : leur concentration est estimée à environ  $10^7$  à  $10^9$  unité formant colonie (UFC) par g de selles chez l'Homme, et serait 1000 fois moindre chez l'animal<sup>9,25</sup>. Une autre différence entre les souches de *E. coli* commensales de l'Homme et celles de l'animal réside dans leur phylogénie. Ainsi, le microbiote humain se compose majoritairement de *E. coli* A et B2 alors que celui des animaux sauvages et domestiques se compose essentiellement de *E. coli* B1<sup>9</sup>. Après la naissance, *E. coli* est parmi les premières espèces bactériennes à coloniser le tractus intestinal, avant l'expansion des anaérobies. Dans l'utérus, l'intestin du fœtus est stérile, et à la naissance, le développement de la flore du nouveau-né se trouve influencé par le type d'accouchement (voie basse ou césarienne), l'hygiène, l'usage d'antibiotiques, et le type d'allaitement (allaitement maternel ou lait en poudre)<sup>26</sup>. La souche initiale de *E. coli* peut ainsi provenir de la flore maternelle, ou de l'environnement hospitalier, et son développement sera modulé par le type d'allaitement. Le pH bas de l'intestin des enfants nourris au lait maternel est plutôt favorable au développement des *Bifidobacteriaceae*, alors que le lait de vache en poudre favorise le développement de *E. coli*, de *Bacteroides* sp. ainsi que de *Clostridium difficile*<sup>26,27</sup>. Après deux ans, la densité de *E. coli* dans les selles se trouve autour de  $10^8$  UFC/g et diminuera graduellement au cours de la vie<sup>9</sup>.

Néanmoins, l'intestin n'est pas l'unique lieu de résidence de *E. coli* car l'environnement constitue l'habitat secondaire de cette espèce. Ainsi, la quantité de *E. coli* présents dans l'environnement, l'eau et les sédiments, représente environ la moitié de la population totale de *E. coli*, qui est estimée à  $10^{20}$  cellules bactériennes à un instant T<sup>9</sup>.

---

<sup>23</sup> J. Penders *et al.*, *Pediatrics*, **118**: 511–521, 2006.

<sup>24</sup> D. M. Gordon *et al.*, *Microbiology* (Reading, England), **149**: 3575–3586, 2003.

<sup>25</sup> L. K. Poulsen *et al.*, *Infection and Immunity*, **62**: 5191–5194, 1994.

<sup>26</sup> Heavey, P. M. and Rowland, I.R., *Microbial Ecology in Health and Disease*, **11**: 75–83, 1999.

<sup>27</sup> J. Penders *et al.*, *FEMS Microbiology Letters*, **243**: 141–147, 2005.

Des interactions biologiques ou symbiose existent entre un hôte et les souches de *E. coli* de son microbiote intestinal, où l'hôte apporte à la bactérie un milieu nutritif stable et riche, et une protection vis-à-vis du milieu extérieur tout en lui garantissant transport et dissémination. En échange, les souches de *E. coli* commensales protègent l'hôte contre la colonisation par des pathogènes (production de bactériocines, etc.)<sup>28,29</sup>. Mais les souches de *E. coli* commensales peuvent elle-mêmes faire partie des bactéries pathogènes, et être responsables d'infections localisées, comme les infections urinaires (cystites et pyélonéphrites), les pneumonies et les abcès profonds, et d'infections généralisées, comme les bactériémies et les méningites néonatales. La virulence extra-intestinale se définit en partie par la synthèse de facteurs de virulence (VFs) permettant la captation du fer, l'adhésion, la biosynthèse de lipopolysaccharides, autant de déterminants qui, en somme, jouent également un rôle dans la colonisation et la survie dans l'environnement intestinal<sup>21</sup>. La barrière entre commensalisme et pathogénicité semble donc mince. En outre, des souches B2 possédant des gènes de virulence, reflet de leur pathogénicité, sont également trouvées en situation commensale, et il a été démontré que les îlots de pathogénicité, cluster de gènes de virulence, peuvent aussi être impliqués dans la colonisation intestinale<sup>21,30</sup>. Enfin, le groupe I, le plus basal au sein de l'arbre des *E. coli* B2, est décrit comme le plus virulent, ce qui plaide en faveur d'un caractère ancestral de la virulence extra-intestinale au sein des B2. La sélection positive de VFs pourrait alors être une coïncidence fortuite du commensalisme.

Les *E. coli* pathogènes se divisent en deux grands groupes, les InPEC et les ExPEC. Ils sont classés en fonction de leurs VFs, de la pathologie induite, de l'organe infecté ou colonisé et des caractéristiques d'invasion<sup>31,32</sup>. Les ExPEC appartiennent majoritairement aux groupes phylogénétiques B2 et D, alors que les InPEC appartiennent plus fréquemment aux autres groupes<sup>13</sup>.

---

<sup>28</sup> S. Hudault *et al.*, *Gut*, **49**: 47–55, 2001.

<sup>29</sup> T. Conway *et al.*, *EcoSal Plus*, **1**: , 2004.

<sup>30</sup> M. Diard *et al.*, *Journal of Bacteriology*, **192**: 4885–4893, 2010.

<sup>31</sup> J. B. Kaper *et al.*, *Nature Reviews Microbiology*, **2**: 123, 2004.

<sup>32</sup> M. A. Croxen *et al.*, *Clinical Microbiology Reviews*, **26**: 822–880, 2013.



Parmi les souches InPEC, six catégories sont ainsi décrites :

- les *E. coli* entéropathogènes (EPEC), qui entraînent la destruction des villosités intestinales, le déclenchement de la réponse inflammatoire et des diarrhées aqueuses profuses,
- les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), qui sécrètent la Shiga toxine provoquant des diarrhées aqueuses et un SHU éventuel,
- les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), qui sécrètent des entérotoxines thermolabiles ou thermostables et provoquent des diarrhées aqueuses,
- les *E. coli* entéro-agrégatifs (EAEC), qui adhèrent à l'épithélium intestinal en fins biofilms, sécrètent des toxines et sont responsables de diarrhées du voyageur ou persistantes,
- les *E. coli* entéro-invasifs (EIEC), qui envahissent les cellules épithéliales du colon et provoquent un syndrome dysentérique,
- les *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC), qui adhèrent de manière diffuse aux entérocytes, recouvrant la totalité de la surface cellulaires, et entraînent des diarrhées infantiles persistantes,
- les *E. coli* adhérent-invasifs (AIEC), qui se trouvent associés aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin comme la maladie de Crohn<sup>31,33,34</sup>.

Certains pathovars, comme les EPEC, EHEC et ETEC, sont également pathogènes chez l'animal, ainsi qu'un pathovar animal additionnel : les *E. coli* aviaires pathogènes (APEC), qui sont responsables d'infections extra-intestinales chez la volaille (principalement des infections respiratoires, des péricardites et bactériémies)<sup>31</sup>.

Au sein des ExPEC, deux pathovars principaux sont décrits : les *E. coli* responsables d'infections urinaires (UPEC) et les *E. coli* responsables de méningites, le plus souvent chez le nouveau-né (MNEC), mais les ExPEC regroupent aussi des souches responsables d'infections intra-abdominales, de pneumonies, d'infections sur matériel, d'ostéomyélites et d'infections des tissus mous. Le tractus urinaire est l'un des sites d'infections à *E. coli* le plus fréquent, infections qui peuvent être classées en fonction de leur sévérité : cystite, pyélonéphrite puis urosepsis. Les UPEC sont la cause principale d'infections du tractus urinaire (UTI) (70% environ)<sup>35</sup> et une minorité de *E. coli* causent la majorité des UTIs : six sérogroupes O sont responsables de 75% des UTIs et possèdent des phénotypes particuliers, dont l'expression de fimbriae P, d'hémolysines, d'aérobactine, de capsule

<sup>33</sup> I. C. A. Scaletsky *et al.*, *Journal of Clinical Microbiology*, **40**: 645–648, 2002.

<sup>34</sup> E. Barrios-Villa *et al.*, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **17**: 42, 2018.

<sup>35</sup> A. L. Flores-Mireles *et al.*, *Nature reviews. Microbiology*, **13**: 269–284, 2015.

et de la résistance au sérum<sup>31</sup>. La majorité des souches UPEC appartiennent donc à un nombre restreint de complexes clonaux, incluant des clones pandémiques comme les ST131, ST69, ST73 et ST95<sup>36-38</sup>, et d'autres clones ayant émergé plus récemment comme les ST10 et ST127<sup>39,40</sup>. *E. coli* est également la bactérie la plus fréquemment incriminée dans les méningites chez le prématuré et la seconde bactérie responsable de méningites néonatales<sup>41</sup>. Les souches MNEC appartiennent à un nombre limité de sérogroupe O, 80% d'entre elles possèdent une capsule K1 et la plupart font partie du ST95 : 56% des souches MNEC appartenait au ST95 lors d'une étude nationale française entre 2001 et 2013<sup>42</sup>.

---

<sup>36</sup> S. Y. Tartof *et al.*, *Journal of Clinical Microbiology*, **43**: 5860–5864, 2005.

<sup>37</sup> R. Banerjee *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**: 5912–5917, 2013.

<sup>38</sup> M. Doumith *et al.*, *Journal of Clinical Microbiology*, **53**: 160–166, 2015.

<sup>39</sup> B. Olesen *et al.*, *Journal of Clinical Microbiology*, **50**: 3703–3711, 2012.

<sup>40</sup> T. M. Gibreel *et al.*, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **67**: 346–356, 2012.

<sup>41</sup> J. Gaschignard *et al.*, *The Pediatric Infectious Disease Journal*, **30**: 212–217, 2011.

<sup>42</sup> R. Basmaci *et al.*, *Clinical Infectious Diseases*, **61**: 779–786, 2015.

### I.3. *E. coli* et résistance aux antibiotiques : un problème de santé publique

*E. coli* est l'espèce bactérienne la plus fréquemment identifiée dans les laboratoires de microbiologie clinique et pose un réel problème de santé à l'échelon mondial<sup>43</sup>. Les diarrhées infantiles à *E. coli* causent environ 2,5 millions de décès chaque année<sup>44</sup>, et 40 000 morts par an sont imputables aux bactériémies à *E. coli* aux Etats-Unis<sup>45</sup>. Environ 150 millions de personnes à travers le monde déclarent une UTI chaque année, et *E. coli* est responsable d'environ 90% des cystites et pyélonéphrites chez la femme en pré-ménopause<sup>45,46</sup>, revenant à plusieurs billions de dollars par an de coûts associés aux soins rien qu'aux Etats Unis<sup>45</sup>.

De par l'implication de *E. coli* dans les infections communautaires, sa multirésistance aux antibiotiques est devenue un problème inquiétant en médecine humaine, qui ne cesse de s'accroître. *E. coli* est intrinsèquement sensible à de nombreuses familles d'antibiotiques, mais est capable d'acquérir et d'accumuler de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques, soit par mutations chromosomiques (résistance aux fluoroquinolones), soit par transfert horizontal pour la majorité des gènes. Les plasmides ainsi que d'autres éléments génétiques mobiles comme les transposons jouent un rôle majeur dans la dissémination des gènes codant les BLSE, conférant la résistance aux C3G, pour les carbapénèmes, conférant la résistance aux carbapénèmes, et pour la résistance aux aminosides, aux fluoroquinolones (gène *qnr* et *AAC(6')-Ib-cr*) et à la colistine<sup>47,48</sup>. En clinique, cette multirésistance aux antibiotiques peut donner lieu à des impasses thérapeutiques. Le rapport sur la surveillance de la résistance aux antibiotiques de 2014 de l'OMS a placé l'espèce *E. coli* dans la liste des pathogènes d'intérêt international pour les infections communautaires, nosocomiales et les infections transmises au travers de la chaîne alimentaire<sup>49</sup>. Ce rapport a, en outre, souligné le problème des résistances aux C3G et aux fluoroquinolones chez cette espèce, résistances qui limitent l'efficacité des traitements de première intention. En effet, on assiste actuellement à une véritable pandémie de BLSE de type CTX-M chez les Entérobactéries, parmi lesquelles *E. coli* est l'espèce la plus affectée<sup>50</sup>.

Dans ce contexte, l'apparition mondiale du clone émergent *E. coli* ST131 résistant aux fluoroquinolones et producteur de BLSE de type CTXM-15 est perçue comme un problème majeur. Aussi,

---

<sup>43</sup> J. Vila *et al.*, FEMS microbiology reviews, **40**: 437–463, 2016.

<sup>44</sup> M. Kosek *et al.*, Bulletin of the World Health Organization, **81**: 197–204, 2003.

<sup>45</sup> T. A. Russo *et al.*, Microbes and Infection, **5**: 449–456, 2003.

<sup>46</sup> M. E. Terlizzi *et al.*, Frontiers in Microbiology, **8**: 1566, 2017.

<sup>47</sup> L. Poirel *et al.*, Microbiology Spectrum, **6**: , 2018.

<sup>48</sup> G. A. Jacoby *et al.*, Microbiology Spectrum, **2**: , 2014.

<sup>49</sup> *Antimicrobial resistance: global report on surveillance* Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2014

<sup>50</sup> D. M. Livermore *et al.*, Trends in Microbiology, **14**: 413–420, 2006.

comprendre et maîtriser son essor sont des enjeux de santé publique<sup>22</sup>.

## II. *Escherichia coli* ST131

### II.1. Prémisses et découverte d'un clone émergent

Au début des années 2000, a été mise en évidence pour la première fois la dissémination de souches clonales de *E. coli* du groupe phylogénétique B2, riches en gènes codant des VFs et résistantes à la fois aux fluoroquinolones et aux C3G *via* la production de BLSE de type CTX-M-15. Cette dissémination a été décrite pour la première fois en France, concomitamment par Kassis-Chikhani *et al.* et Leflon-Guibout *et al.*<sup>51,52</sup>, au sein de souches de *E. coli* isolées en 2002 dans des hôpitaux de long séjour de la région parisienne. De leur côté, Pitout *et al.* publie un an plus tard que 10,7% des souches de *E. coli* productrices de BLSE isolées entre 2000 et 2002 à partir d'infections, principalement urinaires, acquises tant en ville qu'à l'hôpital dans la région sanitaire de Calgary (Canada) sont de groupe phylogénétique B2, résistantes aux fluoroquinolones et productrices de CTX-M-15<sup>53</sup>. Ces études pouvaient laisser entendre que, à l'instar du «clone A», clone de *E. coli* résistant au triméthoprim-sulfaméthoxazole de groupe phylogénétique D et décrit essentiellement aux Etats-Unis<sup>54,55</sup>, un clone du groupe phylogénétique B2 et d'une multirésistance encore plus étendue était en train d'émerger et de diffuser, cette fois-ci sur plusieurs continents.

Cette suggestion fut confirmée par Nicolas-Chanoine *et al.* fin 2007 *via* l'analyse de 36 souches de *E. coli* résistantes aux fluoroquinolones et productrices de CTX-M-15 provenant de sept pays et trois continents: Europe, Asie et Amérique du Nord<sup>56</sup>. En effet, ces souches avaient en commun les caractéristiques supplémentaires suivantes : le sérotype O25:H4, le même profil ERIC2 PCR, le variant EC6 de la céphalosporinase chromosomique (AmpC), et le ST131 définie selon le système de MLST d'Achtman<sup>5</sup>. Toutefois, les analyses de macro-restriction de l'ADN chromosomique par champ pulsé (PFGE) et de 46 gènes codant des VFs classiquement observés chez les ExPEC ont montré de la diversité au sein de ces 36 souches en termes de profils PFGE (17 profils de <85% de similarité) et, dans une moindre mesure, en termes de profils de VFs (13 profils différents avec >90% de similarité). Début 2008, des résultats similaires ont été publiés par Coque *et al.* avec toutefois des informations supplémentaires sur le contenu plasmidique des souches étudiées, montrant qu'un

---

<sup>51</sup> V. Leflon-Guibout *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**: 3736–3742, 2004.

<sup>52</sup> N. Kassis-Chikhani *et al.*, *Emerging Infectious Diseases*, **10**: 1697–1698, 2004.

<sup>53</sup> J. D. D. Pitout *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**: 4667–4670, 2005.

<sup>54</sup> A. R. Manges *et al.*, *The New England Journal of Medicine*, **345**: 1007–1013, 2001.

<sup>55</sup> J. R. Johnson *et al.*, *Emerging Infectious Diseases*, **11**: 141–145, 2005.

<sup>56</sup> M.-H. Nicolas-Chanoine *et al.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **61**: 273–281, 2008.

plasmide IncF contenant les réplicons FII et FIA était majoritairement porté par les souches ST131<sup>57</sup>. Quelques mois plus tard, Clermont *et al.* montrèrent que le clone ST131 était également présent en Afrique et précisèrent de nouvelles caractéristiques de ce clone: appartenance au sous-groupe phylogénétique I, le sous-groupe le plus basal de l'arbre phylogénétique des souches du groupe B2 (Figure 2), présence d'un séro-groupe O25 spécifique dénommé b (O25b) et virulence chez la souris dans un modèle d'infection systémique<sup>58</sup>.

Toutes ces études s'accordaient donc sur l'émergence et la diffusion mondiale d'un clone de *E. coli* du groupe phylogénétique B2 auquel appartiennent majoritairement les ExPEC, clone à la fois multirésistant aux antibiotiques et virulent, ce qui fait de lui un «superbug» et donc un nouveau défi de santé publique. Au regard de cet enjeu, il était urgent de connaître qui est et d'où vient *E. coli* ST131, de circonscrire ses réservoirs et d'être ainsi capable de l'identifier facilement et de manière fiable. De multiples équipes se sont employées à répondre à ces questions.

---

<sup>57</sup> T. M. Coque *et al.*, *Emerging infectious diseases*, **14**: 195–200, 2008.

<sup>58</sup> O. Clermont *et al.*, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **61**: 1024–1028, 2008.

## II.2. Qui est *E. coli* ST131 et d'où vient-il ? Caractérisation d'un clone émergent

### A. Méthodes de typage et caractérisation

Au sein des *E. coli* ST131, initialement décrits avec un sérotype O25b:H4<sup>58</sup>, des souches de sérotype O16:H5 ont été identifiées dans différents pays et continents<sup>59-64</sup>, ainsi que des ST131 non-typables pour l'antigène O ou H<sup>61,63,65</sup>. Le MLST défini par Achtman s'est montré uniforme chez *E. coli* ST131, alors que le MLST de l'institut Pasteur<sup>66</sup> utilisant 8 loci a montré, tout comme le PFGE<sup>56,61,67</sup>, une certaine inhomogénéité dans ce ST, sous-entendant l'existence de multiples sous-clones au sein des ST131.

Ainsi, le typage du gène *fimH*<sup>68</sup>, gène codant l'adhésine terminale du pili de type 1<sup>69</sup>, par ailleurs connu pour être sous forte pression de sélection, *i.e.* accumulation à taux élevés de mutations non synonymes dans ce locus<sup>70</sup>, a également été utilisé pour discriminer les sous-populations au sein des *E. coli* ST131. Ce typage a montré, seul ou associé au typage du gène *fumC* (*fumC-fimH* typing : CHT décrit par Weissman SJ *et al.*<sup>71</sup>), l'existence de plusieurs allèles *fimH* chez ST131 dont les plus fréquents sont *H41*, *H22* et *H30*<sup>71-73</sup>. L'association du séro groupe et du CHT a permis de caractériser trois sous-groupes au sein de ST131 : O16-*fimH41*, O25b-*fimH22* et O25b-*fimH30*, ce qui fait de cette combinaison une méthode pertinente pour la détection des *E. coli* ST131. L'étude longitudinale faite par Johnson *et al.* quant à la distribution des sous-clones *H* au sein de 352 *E. coli* ST131 isolés de 1967 à 2011 et de source humaine, animal, et environnementale, a montré que, sur l'ensemble de la période étudiée, le sous-clone *H30* était le plus fréquent (67%), suivi du sous-clone *H22* (21%) puis des sous-clones *H41* et *H35* (5% chacun)<sup>73</sup>. Cette étude a aussi permis de décrire la

<sup>59</sup> J. L. Platell *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**: 3782–3787, 2011.

<sup>60</sup> T. Kudinha *et al.*, *Clinical Microbiology and Infection*, **19**: E173–E180, 2013.

<sup>61</sup> Y. Matsumura *et al.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **67**: 2612–2620, 2012.

<sup>62</sup> Y. Matsumura *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**: 4736–4742, 2013.

<sup>63</sup> G. Dahbi *et al.*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **42**: 347–351, 2013.

<sup>64</sup> V. Blanc *et al.*, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **69**: 1231–1237, 2014.

<sup>65</sup> S. Suzuki *et al.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **63**: 72–79, 2009.

<sup>66</sup> F. Jaureguy *et al.*, *BMC Genomics*, **9**: 560, 2008.

<sup>67</sup> J. R. Johnson *et al.*, *Emerging Infectious Diseases*, **18**: 598–607, 2012.

<sup>68</sup> R. C. S. Dias *et al.*, *Journal of Clinical Microbiology*, **48**: 483–488, 2010.

<sup>69</sup> S. N. Abraham *et al.*, *Nature*, **336**: 682, 1988.

<sup>70</sup> E. V. Sokurenko *et al.*, *Molecular Biology and Evolution*, **21**: 1373–1383, 2004.

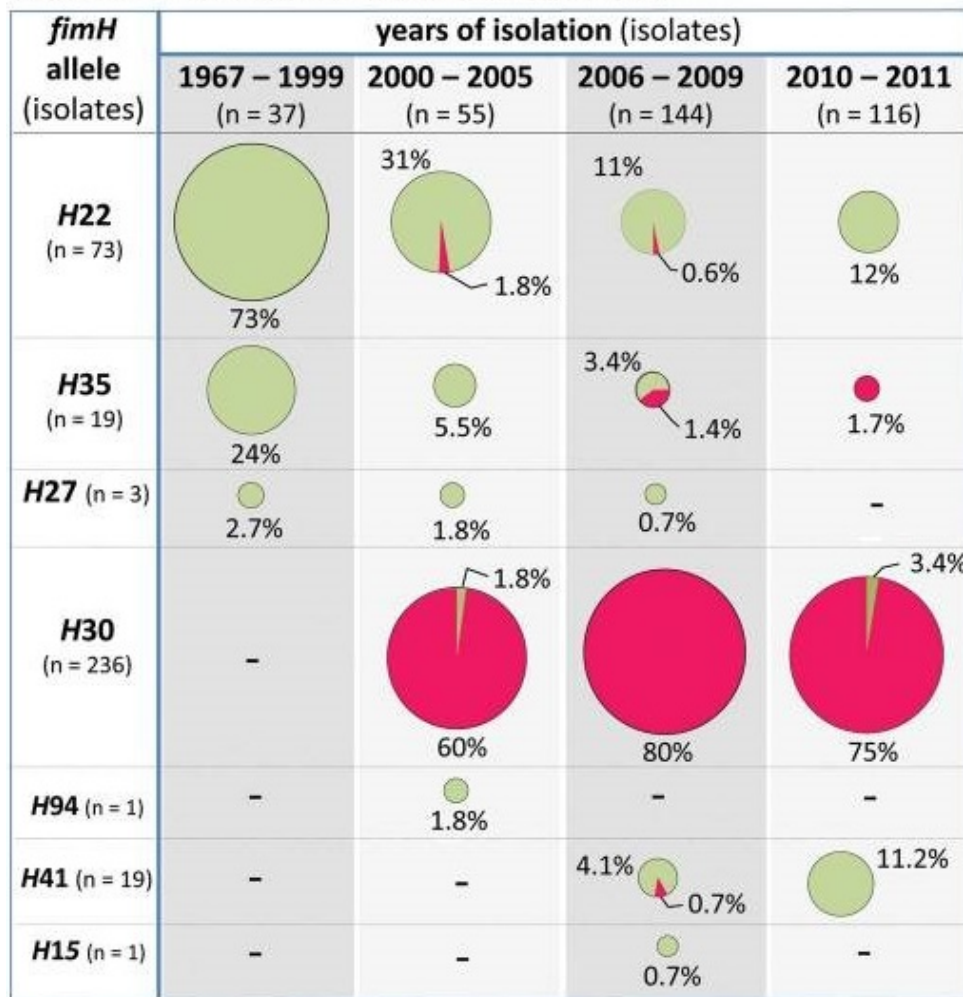
<sup>71</sup> S. J. Weissman *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, **78**: 1353–1360, 2012.

<sup>72</sup> S. Adams-Sapper *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**: 490–497, 2013.

<sup>73</sup> J. R. Johnson *et al.*, *The Journal of Infectious Diseases*, **207**: 919–928, 2013.

dynamique temporelle de ces sous-clones ; le sous-clone *H22* qui était initialement prédominant (73%) a décru et correspondait à 11-12% des ST131 en 2011 ; le sous-clone *H41*, d'apparition plus récente, représentait en 2011 11% des isolats ; enfin, le sous-clone *H30*, devenu dominant dans les années 2000, représentait 75% des ST131 en 2011 (Figure 3)<sup>73</sup>.

***fimH* alleles vs. time and FQ resistance**



**Figure 3. Distribution des isolats sensibles ou résistants aux fluoroquinolones (FQ) parmi les sept sous-clones de ST131 basés sur l'allèle *fimH* (*H*), d'après Johnson *et al.*<sup>73</sup>. Isolés entre 1967 et 2009 ; de source humaine, animal, provenant de la nourriture ou de l'environnement. Distribution clonale au cours de périodes données. Taille du cercle : relative abondance du sous-clone *H* au cours de la période donnée ; vert : sensible aux FQ ; rouge : résistants aux FQ ; les pourcentages sont relatifs au nombre total d'isolats de la période donnée.**

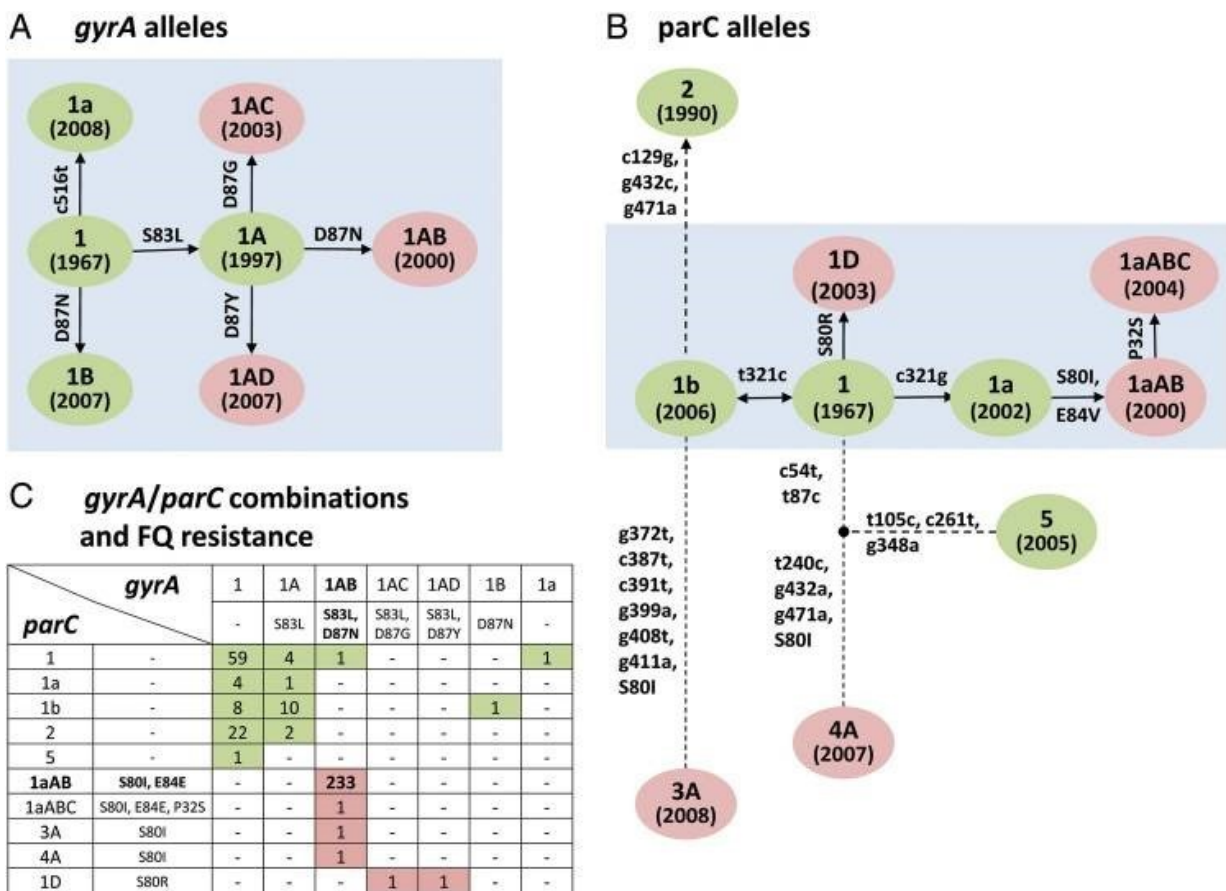
Les années suivant la découverte de ST131, des descriptions d'isolats de ces sous-clones révélèrent une certaine complexité au regard de la résistance aux fluoroquinolones : existence d'isolats cliniques responsables d'infections urinaires<sup>74</sup> ou d'isolats de portage digestif<sup>75</sup> résistants

<sup>74</sup> J. R. Johnson *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**: 2733–2739, 2009.

<sup>75</sup> V. Leflon-Guibout *et al.*, *Journal of Clinical Microbiology*, **46**: 3900–3905, 2008.



aux fluoroquinolones sans production de CTXM-15 et celle d'isolats de portage digestif sensibles aux fluoroquinolones<sup>75</sup>. L'analyse des gènes conférant la résistance aux fluoroquinolones chez ST131 corrobore ces données phénotypiques : Johnson *et al.* ont décrit sept allèles *gyrA* et dix allèles *parC* chez ST131, ne différant entre eux que par un seul nucléotide («single nucleotide polymorphism», SNP), ce qui suggère une évolution par mutation ponctuelle (Figure 4). Dix-huit combinaisons de ces allèles ont été identifiées (Figure 4C), les plus fréquemment observées étant *gyrA1/parC1* pour les isolats sensibles aux fluoroquinolones et *gyrA1AB/parC1aAB* pour les résistants. Enfin, l'histoire évolutive des allèles *gyrA* et *parC* chez ST131 suggèrent que les souches résistantes aux fluoroquinolones sont apparues vers les années 2000 (Figure 4 A et B).



**Figure 4. Les allèles des gènes *gyrA* et *parC* associés à *E. coli* ST131 : phylogénie des gènes et combinaisons, d'après Johnson *et al.*<sup>73</sup>. Vert : allèles ou combinaisons associés avec les isolats sensibles aux fluoroquinolones (FQ) ; rose : allèles ou combinaisons associées avec les isolats résistants aux FQ. Les acides aminés sont en lettres majuscules. A et B : Phylogénie des gènes *gyrA* et *parC* associés à *E. coli* ST131. Au sein des cercles : nom de l'allèle et (date la plus ancienne d'identification). Inscriptions le long des traits en minuscules : mutations silencieuses, en majuscules : mutations impliquant un changement d'acides aminés. C : combinaisons possibles des allèles *gyrA* et *parC* et nombres d'isolats de ST131 possédant la combinaison correspondante ; en gras : combinaison majoritaire.**

## B. Histoire évolutive de *E. coli* ST131 à la lumière du séquençage de génome complet

L'exploitation des séquences du génome complet de souches de *E. coli* ST131 fut déterminante pour la compréhension de l'histoire évolutive de ST131. En 2013, Price *et al.* séquencèrent le génome entier de 105 souches de *E. coli* ST131 provenant d'isolats humains, animaux, de nourriture et de l'environnement et obtenues aux Etats Unis et en Allemagne de 1967 à 2011<sup>76</sup>. Ils générèrent un arbre phylogénétique à partir des SNPs et analysèrent principalement l'évolution des souches du sous-clone *H30*. Cet arbre montre que l'acquisition de l'allèle *fimH30* a précédé celle de la résistance aux fluoroquinolones. Cette acquisition de résistance s'est accompagnée d'une large expansion clonale, d'une part, de souches résistantes aux fluoroquinolones formant le sous-groupe *H30* nommé *H30-R*, et d'autre part, de souches résistantes aux fluoroquinolones et productrices de CTX-M-15 formant le sous-groupe *H30* nommé *H30-Rx*, se distinguant du reste des *H30* par deux SNPs caractéristiques.

De nouvelles études du génome complet de souches de ST131 du sous-clone *H30* mais aussi non-*H30* ont par la suite généré des arbres phylogénétiques à partir des SNPs, en excluant cette fois les régions recombinantes<sup>77,78</sup>. De ces études est sortie une nouvelle nomenclature définissant trois clades : A, B et C, du plus ancestral au plus récent :

- Le clade A, comprenant la souche de référence SE15, est le clade le plus divergent (différence d'environ 7000 et 8900 SNPs avec les clades B et C, respectivement). Il se caractérise par le sérotype O16:H5, l'allèle *fimH41*, et différents variants des gènes *gyrA* et *parC* ne conférant pas de résistance aux fluoroquinolones.
- Le clade B, plus proche du clade C que ne l'est le clade A (environ 2900 SNPs de différence avec le clade C), se caractérise par le sérotype O25b:H4, l'allèle *fimH22* et des variants des gènes *gyrA* et *parC* ne conférant pas de résistance aux fluoroquinolones
- Le clade C se caractérise par le sérotype O25b:H4, l'allèle *fimH30*, les allèles *gyrA1AB* et *parC1aAB* conférant la résistance aux fluoroquinolones et par une séquence d'insertion de 1895 paires de bases (bp), ISEc55, dans le gène *fimB*<sup>79</sup>, le rendant non-fonctionnel.

Cette classification par clades est désormais usitée, et c'est donc celle que nous utiliserons au cours de ce travail. Il est intéressant de remarquer que les clades « ancestraux » A et B sensibles aux fluoroquinolones avaient déjà été mis en évidence par Price *et al.*, mais ces données n'avaient pas

<sup>76</sup> L. B. Price *et al.*, mBio, 4: , 2013.

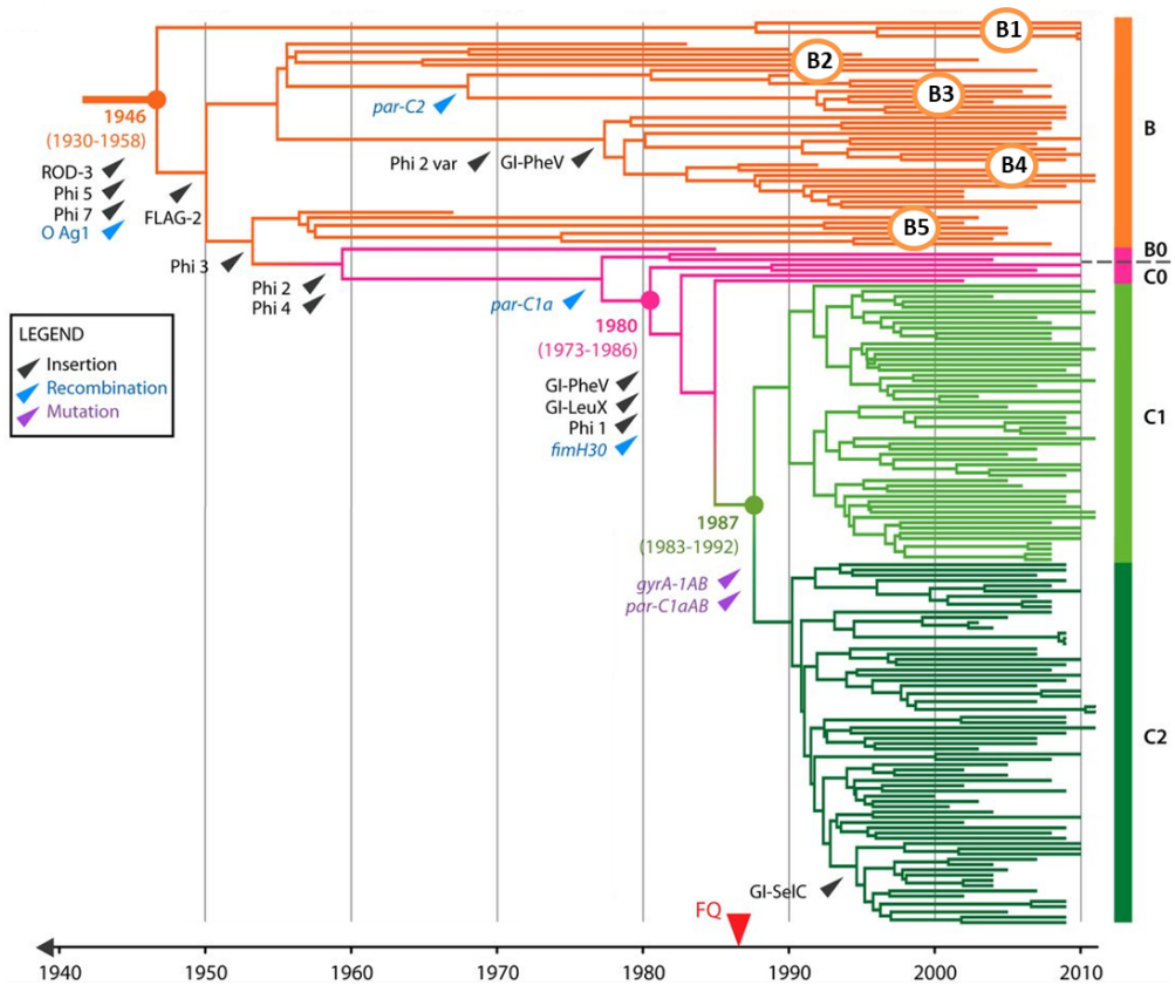
<sup>77</sup> N. K. Petty *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 111: 5694–5699, 2014.

<sup>78</sup> N. L. Ben Zakour *et al.*, mBio, 7: , 2016.

<sup>79</sup> M. Totsika *et al.*, PLOS ONE, 6: e26578, 2011.

été exploitées par les auteurs<sup>76</sup>.

Grâce à une phylogénie temporelle, Ben Zakour *et al.* (Figure 5) montrent que l'histoire évolutive de *E. coli* ST131 est ponctuée d'évènements mutationnels, de recombinaisons et d'insertions de régions prophagiques ou d'îlots génomiques<sup>78</sup>. La diversité inter-clades semble être avant tout expliquée par des évènements de recombinaisons, puisqu'après retrait des régions recombinantes, seuls 42 SNPs différent entre les clades B et C.



**Figure 5. Scenario évolutif de l'émergence des clades B et C de ST131, d'après Ben Zakour *et al.*<sup>78</sup>.** Phylogénie calibrée dans le temps à partir des SNPs non-recombinants de 172 souches de clade B et C. Arbre de crédibilité de clade maximale, coloré en fonction de l'origine du clade : B en orange, les intermédiaires B0 et C0 en rose, C1 en vert clair et C2 en vert foncé, et raciné sur une souche de clade A (SE15). L'axe des x indique les estimations de périodes d'émergence des souches. Les évènements évolutifs majeurs sont indiqués par des flèches au niveau des branches où leur survenue a été prédite. La flèche rouge indique la première introduction clinique des fluoroquinolones (FQ).

Selon l'arbre phylogénétique présenté dans la Figure 5, la divergence du dernier ancêtre commun aux clades B et C serait survenue entre 1930 et 1958. Le clade B a alors évolué en cinq sous-clades, de B1 à B5 (B1 étant le plus ancestral), se distinguant entre eux par l'occurrence de différents événements. Le premier événement est l'acquisition du locus FLAG-2, codant un système flagellaire, suivie par la distinction des sous-clades B en deux grands groupes, l'un incluant les sous-clades B2, B3 et B4, l'autre incluant le sous-clade B5 et la lignée progénitrice du clade C. Au sein du premier groupe, surviennent successivement l'acquisition par recombinaison de l'allèle *parC2* caractérisant le sous-clade B3, puis les acquisitions d'un variant Phi2 et de l'îlot génomique PheV caractérisant le sous-clade B4. Au sein du deuxième groupe, l'ensemble des sous-clades ont acquis la région prophagique Phi3, puis les régions prophagiques Phi2 et Phi4 et de l'allèle *parC1a* par recombinaison qui distingue les lignées B0 et C0, progénitrices du clade C, du sous-clade B5. Enfin, dans les années 80 a lieu la divergence du clade C à partir du clade B, qui se caractérise par l'acquisition par la lignée C0 des îlots génomiques PheV et LeuX, de la région prophagique Phi1 et de l'allèle *fimH30*, donnant alors naissance au clade C. L'îlot PheV est connu pour contenir les gènes *Ag43* et *sat* (autotransporteurs), le cluster *iucABCD* codant la biosynthèse de l'aérobactine et le gène *iutA* codant le récepteur du sidérophore<sup>79</sup>. La recombinaison de l'allèle *fimH* en *fimH30* est un événement marquant de l'évolution de ST131, potentiellement concomitant de l'insertion de *ISEc55* dans le gène codant la recombinase FimB et de l'acquisition de l'îlot génomique LeuX voisin. Enfin, en 1987, l'acquisition par le clade C des allèles *gyrA1AB* et *parC1aAB* conférant la résistance aux fluoroquinolones s'accompagne de l'émergence des deux sous-clades C1 et C2, C1 regroupant les souches non productrices de BLSE et C2 les souches productrices de CTX-M-15. Outre le gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, les souches C2 possèdent davantage de gènes de résistance aux antibiotiques que les autres souches ST131, ce qui peut être expliqué par la localisation concomitante de ces gènes sur un même plasmide de résistance. Toutefois, d'autres études ont montré que le gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub> n'était pas systématiquement présent chez les souches du sous-clade C2, la cassette de multi-résistance pouvant être partiellement tronquée<sup>80</sup>. Aussi, une PCR spécifique ciblant les SNPs du gène *nrpI* (codant une ribonucléotide réductase) a été mise au point pour discriminer ce sous-groupe non producteur de CTX-M-15 au sein du sous-clade C2<sup>81</sup>.

L'histoire évolutive n'est pas figée, et la diversification des souches de ST131 s'est poursuivie. Ainsi, un nouveau cluster appartenant au sous-clade C1, dénommé C1-M27, a été identifié en

<sup>80</sup> T. J. Johnson *et al.*, *mSphere*, **1**: , 2016.

<sup>81</sup> Y. Matsumura *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **61**: , 2017.

2016<sup>82</sup>. Les souches de ce cluster se caractérisent par la production de BLSE de type CTX-M-27, et possèdent comme marqueur spécifique la région prophage-like M27PP1<sup>82</sup>. Initialement décrit au Japon, C1-M27 a été identifié à ce jour sur différents continents, majoritairement en Asie et en Europe, dans des prélèvements cliniques et en portage digestif dans la communauté et en milieu hospitalier, chez l'Homme (enfants et adultes), chez l'animal et dans des prélèvements d'eaux usées<sup>64,83-92</sup>.

Selon la collection de souches ST131 étudiée par Ben Zakour *et al.*, la taille de la population de *E. coli* ST131 aurait été constante entre les années 1940 et 1990, puis aurait subi une brutale augmentation de par l'apparition des souches de clade C, suivie d'une stabilisation<sup>78</sup>. Au regard de la phylogéographie de ST131, le clade A semble originaire du Sud-Est asiatique, alors que les clades B et C semblent plutôt originaires d'Amérique du Nord, en particulier des Etats Unis, avec une diffusion ultérieure en Europe et en Asie<sup>78,93</sup>. Aucun regroupement temporel ou géographique des principaux clades n'a pu être observé, mais au sein de chaque clade, des sous-lignées de souches très proches présentent en revanche une association géographique. Ces données suggèrent une histoire évolutive plus complexe qu'une expansion clonale géographique standard, comme en témoignent les nombreuses occurrences de souches presque identiques isolées dans différents pays et continents et sur différentes périodes de temps<sup>78,93</sup>.

### C. *E. coli* ST131 et plasmides

#### i. Les plasmides

Les plasmides sont des éléments génétiques extra-chromosomiques mobiles présents chez de nombreuses bactéries, définis par une molécule d'ADN double brin circulaire ou linéaire capable de réplication autonome. Ils portent à la fois une origine de réplication (site *ori*, protéines Rep) et des

---

<sup>82</sup> Y. Matsumura *et al.*, *Emerging Infectious Diseases*, **22**: 1900–1907, 2016.

<sup>83</sup> R. Gomi *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **61**: , 2017.

<sup>84</sup> S. Sghaier *et al.*, *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **17**: 189–194, 2019.

<sup>85</sup> M. Sauget *et al.*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **48**: 744–747, 2016.

<sup>86</sup> H. Ghosh *et al.*, *Emerging Infectious Diseases*, **23**: 1754–1756, 2017.

<sup>87</sup> L. Micenková *et al.*, *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **20**: 610–617, 2014.

<sup>88</sup> A. Birgy *et al.*, *Emerging Infectious Diseases*, **23**: 885, 2017.

<sup>89</sup> I. Merino *et al.*, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **73**: 2973–2980, 2018.

<sup>90</sup> C. Rodrigues *et al.*, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **71**: 1120–1122, 2016.

<sup>91</sup> A. Birgy *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **63**: , 2019.

<sup>92</sup> L. C. Melo *et al.*, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, , 2019.

<sup>93</sup> N. Stoesser *et al.*, *mBio*, **7**: e02162, 2016.

facteurs de contrôle de la réplication : ARN antisens, itérons. Ainsi, contrôlent-ils eux-mêmes leur nombre de copies au sein de la cellule, indépendamment du chromosome bactérien. Lorsque deux plasmides possèdent le même système de contrôle de réplication, ils ne peuvent pas coexister dans la même bactérie de façon stable : ils sont dits incompatibles. Ce système de contrôle de réplication est à la base de la classification des plasmides selon les groupes d'incompatibilité (groupes Inc). Les plasmides peuvent également se différencier par leur capacité de mobilisation. Les plasmides conjugatifs possèdent deux ensembles de gènes, le relaxosome (ou système MOB) et le transférosome (système de sécrétion), qui leur permettent de se transmettre entre bactéries de différentes espèces par conjugaison. Les plasmides mobilisables possèdent uniquement le complexe MOB, et peuvent être transférés en présence d'un plasmide «helper». Les plasmides non conjugatifs ne possèdent aucun des deux complexes, et ne sont donc pas mobilisables.

Les groupes Inc sont donc utilisés pour classer les plasmides. La méthode de référence, «PCR-based replicon typing», développée par Carattoli *et al.* en 2005, cible les séquences d'origine de réplication (*ori*), les ARN antisens pour le contrôle (RNAI), la protéine de la réplication (RepA), le système de partition (*parA/parB*) et les itérons (régions de contrôle et de fixation de RepA). Elle a permis la mise en évidence des groupes Inc suivants : HI1, HI2, I1, X, L/M, N, FIA, FIB, FIC, FII, F, P, W, T, A/C, K, B/O, Y. Au total 27 groupes ont été répertoriés, incluant six variants FII (FII à VII) et trois variants FI (FIA, FIB et FIC)<sup>94</sup>. Plus récemment de nouveaux groupes ont été décrits : FIIs (résident de *Salmonella* spp.), FIik (résident de *K. pneumoniae*), ainsi que les groupes U et R<sup>95</sup>.

#### ii. Les plasmides de *E. coli* ST131

Une grande hétérogénéité de plasmides est observée chez *E. coli* ST131 : plasmides de groupe IncF, IncI1, IncN et plus rarement, IncA/C, IncX, IncU, IncY, IncK, IncB/O mais aussi des plasmides ColE1, Rep-like, ainsi que des plasmides ne possédant pas de relaxases : RepFIB et certains petits plasmides non-mobilisables<sup>22,62,96</sup>. Ces plasmides sont associés à la diffusion des bêta-lactamases de classe A : CTX-M, TEM, SHV et KPC ; de classe B : NDM et VIM ; de classe C : CMY et de classe D : OXA, et à la diffusion de gènes codant la résistance à différentes familles d'antibiotiques : tétracyclines, macrolides, aminosides, thriméthoprime-sulfaméthoxazole, localisé sur des îlots génomiques composites souvent dérivés de plasmides IncF<sup>96</sup>.

#### Les plasmides de groupe IncF

Les plasmides IncF sont présents dans quasiment toutes les souches ST131<sup>93</sup>. Les premières

<sup>94</sup> A. Carattoli *et al.*, Journal of Microbiological Methods, **63**: 219–228, 2005.

<sup>95</sup> A. García-Fernández *et al.*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **63**: 274–281, 2008.

<sup>96</sup> V. F. Lanza *et al.*, PLoS genetics, **10**: e1004766, 2014.

séquences complètes de plasmides portés par ST131 ont été obtenues en 2009 pour deux plasmides IncF (pEK499 et pEK516)<sup>97</sup>. Ces plasmides possédaient des gènes de résistance à de nombreuses familles d'antibiotiques, dont *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3)-II*, *mph(A)*, *catB4*, *tetA*, *dfrA7*, *aadA5*, et *sul1*. Ils portaient également plusieurs systèmes toxine-antitoxines, leur permettant de persister dans les cellules en l'absence de pression antibiotiques, comme VagCD, PemKI et Hok-Sok.

Il a été récemment démontré qu'il existait une association entre les réplicons IncF et les différents clades<sup>93</sup>, et que les combinaisons d'allèles des réplicons FII, FIA et FIB étaient fortement corrélées au contexte phylogénétique des souches<sup>80</sup>.

En effet, au sein des souches des clades ancestraux A et B, les allèles les plus communs sont F18, F29, B1 et B10, F29:B10 étant la combinaison la plus fréquente et étant par ailleurs absente des sous-clades C1 et C2. Parmi les souches de clade C, les réplicons F1:A2:B20 sont associés aux souches de sous-clade C1 (sans *bla*<sub>CTX-M-15</sub>) alors que les réplicons F2:A1 sont associés aux souches de sous-clade C2 (porteur de *bla*<sub>CTX-M-15</sub>). L'hypothèse principale serait que ces trois types de plasmides F29:B10, F1:A2:B20 et F2:A1, présentant des traits chevauchants, auraient été introduits de manière indépendante dans le clone ST131<sup>80</sup>. Johnson *et al.* ont proposé un enchaînement d'évènements menant aux plasmides circulant actuellement chez ST131 (Figure 6) :

- Introduction d'un plasmide de type F2:A1 dans le clade B ou le sous-clade C0, et perte sub-séquente des plasmides ancestraux de type F29:B10,
- Evolution du clade C à partir de C0 en deux sous-clades C1 et C2, avec perte du réplicon FIB,
- Acquisition par le sous-clade C1 du plasmide F1:A2:B2, et perte du plasmide F2:A1:B-
- Conservation du plasmide F2:A1:B- par le sous-clade C2 et acquisition d'une cassette de multi-résistance contenant *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *catB4*, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *aac(6')Ib-cr*, et *tetAR* dans ce plasmide, *via* des évènements dirigés par la séquence d'insertion IS26. Cette séquence existe en effet en grand nombre de copies dans les plasmides de ST131, et est connue pour jouer un rôle majeur dans l'évolution plasmidique à travers des transpositions replicatives<sup>98</sup>. IS26 a donc eu une influence importante dans l'évolution des plasmides de ST131, et ce essentiellement par le biais de transpositions intermoléculaires. De multiples insertions de IS26 sont trouvées dans la région de transfert F des plasmides du sous-clade C2, et pourraient être responsables de la déficience de transfert spontané à une bactérie hôte observée pour ces plasmides<sup>80</sup>. Le gène

<sup>97</sup> N. Woodford *et al.*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **53**: 4472–4482, 2009.

<sup>98</sup> S. He *et al.*, mBio, **6**: e00762–15, 2015.

*bla*<sub>CTX-M-15</sub> se trouve fréquemment localisé 48 pb en aval de la répétition inversée droite de la séquence d'insertion *ISEcpI*, au sein d'une unité de transposition *ISEcpI-bla*<sub>CTX-M-15</sub>-ORF477 nichée dans un transposon Tn2 ; cela serait compatible avec l'introduction ultérieure de cette unité *ISEcpI-bla*<sub>CTX-M-15</sub>-ORF477 chez ST131, suivie de réarrangements impliquant par exemple IS26<sup>93</sup>.

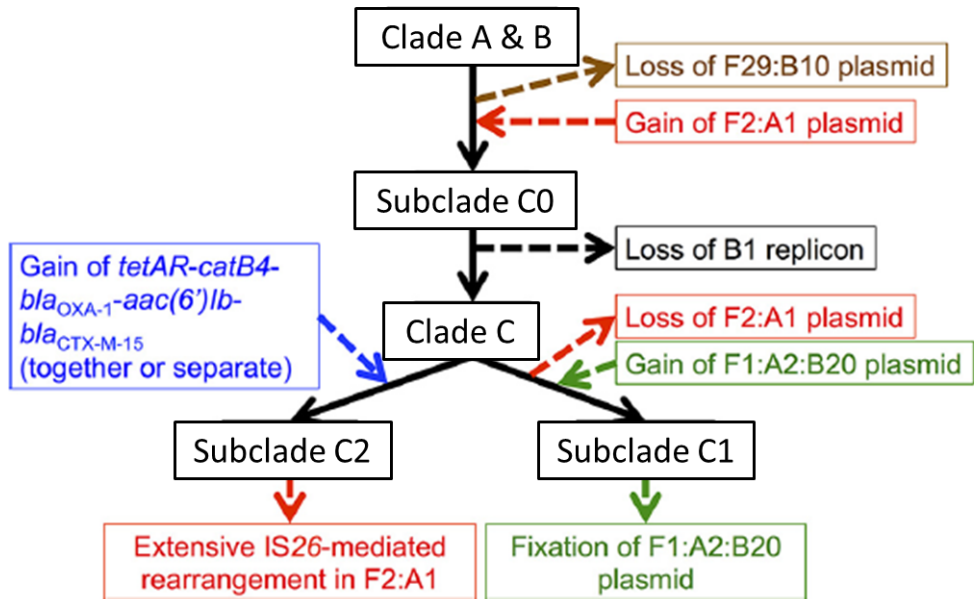


Figure 6. Proposition d'événements menant à l'apparition de plasmides circulant actuellement chez ST131, adapté de Johnson *et al.*<sup>80</sup>



Il est intéressant de noter que les gènes *bla*<sub>CTX-M</sub> sont quasiment absents du clade B, les *bla*<sub>CTX-M14/14-like</sub> étant associés au clade A et sous-clade C1, et les *bla*<sub>CTX-M-15</sub> au clade C2<sup>93</sup>. Par la suite, il a également été observé des intégrations de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> dans le chromosome, ou la perte de la cassette de multi-résistance chez certaines souches C2<sup>80,93</sup>. Les plasmides IncF peuvent également porter, chez ST131, d'autres gènes codant des BLSE, comme CTX-M-14, SHV-2, SHV-12 ou même des carbapénèmases comme NDM-1<sup>22</sup>. La présence de plasmides IncF porteur de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> semble être centrale dans le succès mondial de ST131, et aurait significativement contribué à la dominance du sous-clade C2, de par l'apport de gènes de résistance et de virulence<sup>99,100</sup>.

Enfin, les sous-clades C1 et C2 semblent avoir co-évolué avec leurs plasmides IncF de sorte à les porter à moindre coût<sup>80,101,102</sup>. Johnson *et al.* ont en effet montré que le port du plasmide incluant le gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub> chez la souche JJ186 (souche ST131 de sous-clade C2) avait un coût plus important chez *E. coli* K-12 que chez ST131 de sous-clade C0, et que ce port n'entraînait aucun coût chez ST131 de sous-clade C1<sup>80</sup>. Des changements adaptatifs auraient permis de minimiser le coût du port de plasmides IncF chez les sous-clades C1 et C2, favorisant leur fixation au sein de ces sous-clades et jouant ainsi un rôle important dans le succès de leur hôte.

#### Les plasmides appartenant aux autres groupes Inc

Des plasmides de groupes d'incompatibilité autres que IncF ont été décrits chez ST131, porteurs ou non de gènes de résistance aux antibiotiques :

- IncI1 et gènes codant les BLSE CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-15 et la céphalosporinase CMY-2<sup>22,103,104</sup>. La première séquence complète d'un plasmide IncI1 trouvé chez ST131 a été obtenue en 2009<sup>97</sup>. Les plasmides IncI1 sont significativement associés au sous-clade C1<sup>93</sup>
- IncN et gènes codant les BLSE CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-65, mais aussi des gènes codant les carbapénèmases OXA-48-like et KPC-2<sup>22,105-107</sup>
- IncA/C et gènes codant la carbapénémase NDM-1<sup>22</sup>
- IncL/M et gènes codant la carbapénémase OXA-48<sup>105</sup>

<sup>99</sup> A. Colpan *et al.*, *Clinical Infectious Diseases*, **57**: 1256–1265, 2013.

<sup>100</sup> R. Banerjee *et al.*, *Infection control and hospital epidemiology*, **34**: 361–369, 2013.

<sup>101</sup> K. Schaufler *et al.*, *Frontiers in Microbiology*, **7**: 336, 2016.

<sup>102</sup> A. Ranjan *et al.*, *Gut Pathogens*, **10**: 24, 2018.

<sup>103</sup> L. Roer *et al.*, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **74**: 557–560, 2019.

<sup>104</sup> A. Mora *et al.*, *Scientific Reports*, **8**: 4678, 2018.

<sup>105</sup> N. Stoesser *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **60**: 6948–6951, 2016.

<sup>106</sup> P. McGann *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **59**: 3556–3562, 2015.

<sup>107</sup> L. Chen *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58**: 2422–2425, 2014.

- IncH : plasmides significativement associés au clade B<sup>93</sup>
- IncX<sup>104</sup>
- IncQ1<sup>104</sup>

### Les plasmides Col

Les plasmides de type Col sont fréquents chez les souches de *E. coli* ST131, sans spécificité de clade<sup>93,96</sup>. Les plasmides Col représentent une famille peu explorée, car ils portent rarement des gènes codant la résistance aux antibiotiques. En revanche, ils portent souvent des gènes codant des colicines, qui sont des peptides antimicrobiens généralement actifs sur les souches de même espèce, et de potentiels facteurs de virulence<sup>87,108</sup>. Ces plasmides Col promeuvent également les réarrangements et contribuent à la mobilisation d'autres plasmides<sup>109</sup>. Parmi ces plasmides, les plasmides ColV sont typiques des souches APEC. Ils sont identifiés chez 80% des isolats cliniques aviaires de *E. coli*, apportant une capacité augmentée de colonisation et d'infection de la chair de dinde et de poulet, mais ils sont rarement trouvés en clinique humaine<sup>110</sup>. Une récente publication a identifié le plasmide ColV dans 84% d'isolats provenant de viande de poulet et 25% d'isolats cliniques humains de *E. coli* ST131 appartenant au clade B, suspectant la volaille d'être une source potentielle de ces *E. coli* ST131 de clade B chez l'Homme<sup>110</sup>.

---

<sup>108</sup> M. Budič *et al.*, PloS One, **6**: e28769, 2011.

<sup>109</sup> M. Rijavec *et al.*, Applied and Environmental Microbiology, **73**: 1029–1032, 2007.

<sup>110</sup> C. M. Liu *et al.*, mBio, **9**: , 2018.

### II.3. Épidémiologie de *E. coli* ST131

L'utilisation des antibiotiques pour les soins médicaux chez l'Homme et l'animal s'est accompagnée d'une large dissémination de bactéries multirésistantes aux antibiotiques, y compris *E. coli*, au sein de ces hôtes mais aussi dans l'environnement (sols et eaux de surface)<sup>111,112</sup>. Par conséquent, le risque de portage digestif de *E. coli* multirésistants aux antibiotiques n'est plus réservé aux patients hospitalisés. La contamination inter-hôtes et l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés<sup>113-115</sup> sont incriminés dans la diffusion communautaire de ces bactéries, diffusion également favorisée par les voyages à l'étranger<sup>116,117</sup>. En effet, les humains colonisés sont susceptibles de disséminer ces bactéries multirésistantes en grande quantité dans l'environnement *via* les eaux usées, bactéries qui peuvent contaminer ensuite les animaux d'élevage, les animaux sauvages et les sols, établissant ainsi un modèle cyclique de distribution de la résistance (Figure 7). Bien que les clones de *E. coli* multirésistants aux antibiotiques soient fréquemment décrits comme différents chez l'Homme et l'animal, l'hypothèse d'une communauté de la résistance chez l'Homme et l'animal est soutenue par la circulation simultanée de mêmes plasmides dans ces deux populations, la possibilité d'échanges de bactéries inter-espèces et de transmission de bactéries par transfert horizontal entre l'Homme et l'animal *via* l'alimentation<sup>114</sup>. L'émergence mondiale de souches résistantes aux fluoroquinolones et productrices de BLSE du clone ST131, confrontée à ce cycle de diffusion de la résistance aux antibiotiques, a incité de nombreuses équipes à rechercher ce clone dans tous les réservoirs possibles.

---

<sup>111</sup> X.-X. Zhang *et al.*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **82**: 397–414, 2009.

<sup>112</sup> F. Baquero *et al.*, *Current Opinion in Biotechnology*, **19**: 260–265, 2008.

<sup>113</sup> K. Veldman *et al.*, *International Journal of Food Microbiology*, **177**: 72–77, 2014.

<sup>114</sup> S. N. Seiffert *et al.*, *Drug Resistance Updates*, **16**: 22–45, 2013.

<sup>115</sup> H. Blaak *et al.*, *PLOS ONE*, **10**: e0127752, 2015.

<sup>116</sup> G. Peirano *et al.*, *CMAJ open*, **5**: E850–E855, 2017.

<sup>117</sup> L. Armand-Lefèvre *et al.*, *Medecine Et Maladies Infectieuses*, **48**: 431–441, 2018.

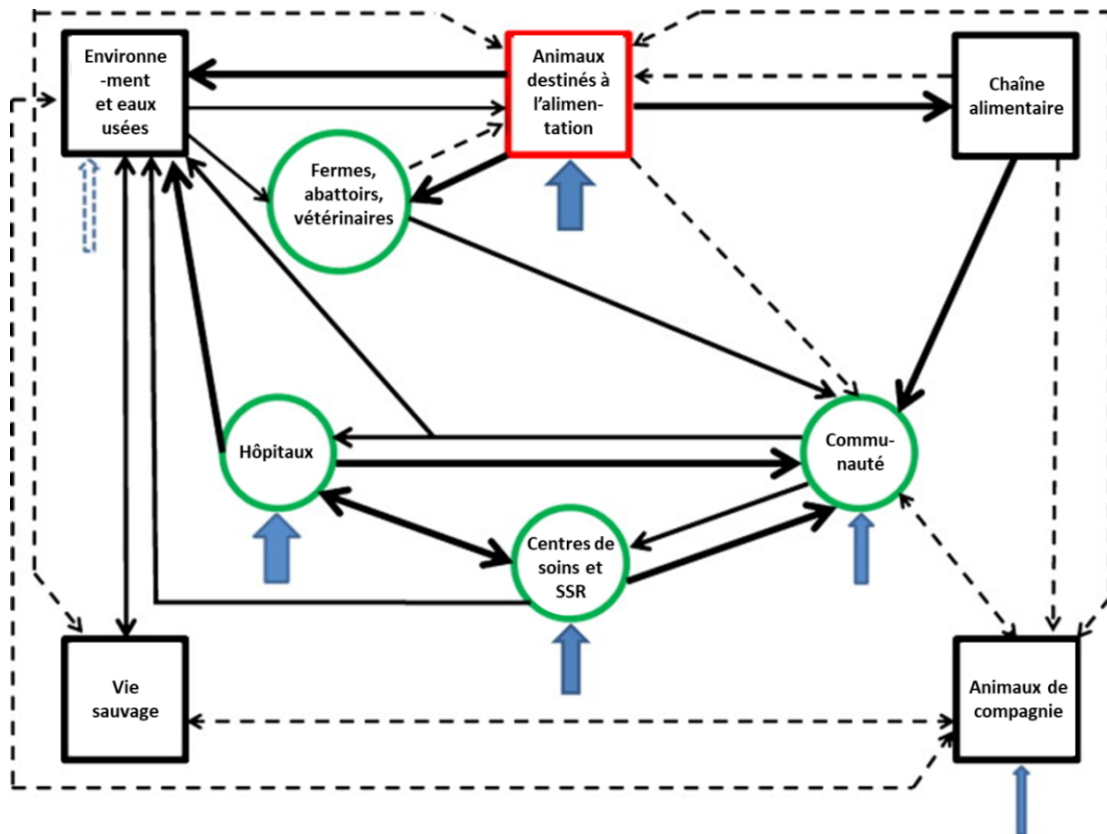


Figure 7. Paramètres contribuant au pool de la résistance antimicrobienne et à la transmission de bacilles à Gram négatif multi-résistants chez les humains, les animaux, les aliments et l'environnement, adapté de Seiffert *et al.*<sup>114</sup>. En vert : paramètres humains; en rouge : paramètres des animaux d'élevage ; flèches bleues : utilisation ou présence d'antibiotiques, la taille des flèches étant proportionnelle à la pression de sélection ; flèches noires en trait plein : transmissions de bactéries résistantes démontrées scientifiquement ; flèches noires en pointillés : possibles transmissions non démontrées scientifiquement.

## A. Épidémiologie humaine de ST131

### i. *E. coli* ST131, un pathogène émergent multirésistant aux antibiotiques

Le Centre européen de prévention et contrôle des maladies estime le nombre d'infections à *E. coli* résistants aux C3G à environ 300 000 en Europe en 2015, dont environ 9 000 se soldent par un décès attribuable à la résistance aux antibiotiques. Environ 22% de la diminution de l'espérance de vie en bonne santé due aux infections à bactéries multirésistantes sont imputables aux infections à *E. coli* résistant aux C3G<sup>118</sup>. *E. coli* ST131 s'inscrit dans ce contexte comme le clone mondial majoritairement responsable de la pandémie causant annuellement des millions d'infections résistantes aux antibiotiques (Figure 8).

<sup>118</sup> A. Cassini *et al.*, The Lancet Infectious Diseases, **19**: 56–66, 2019.

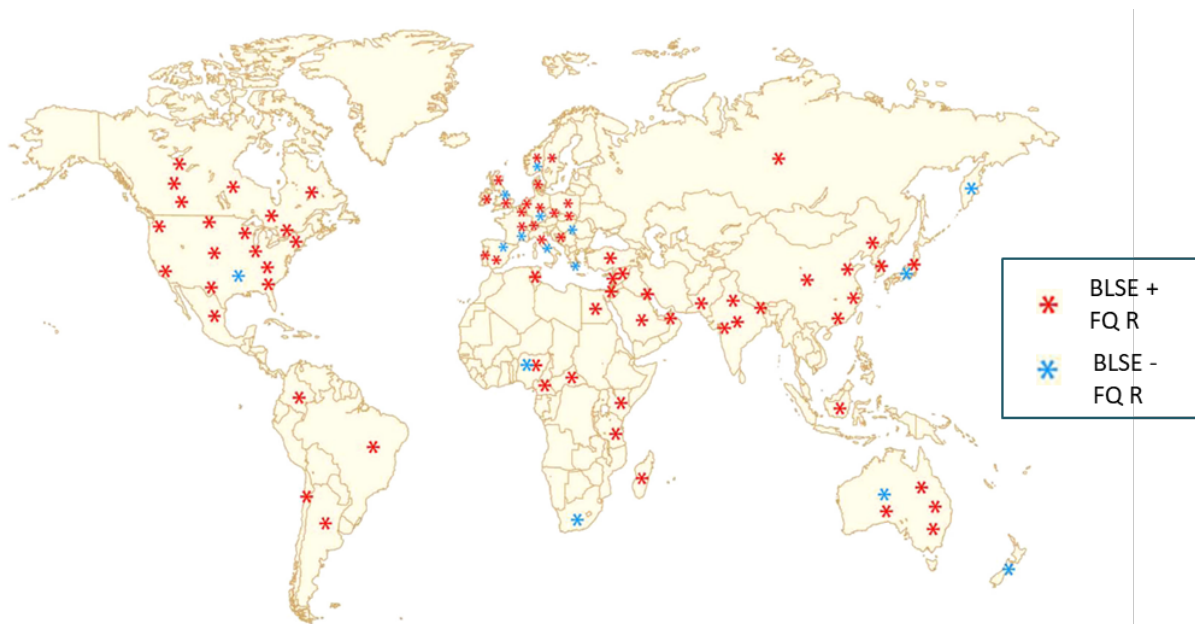


Figure 8. Dissémination globale de *E. coli* ST131 en 2013, Nicolas-Chanoine *et al.*<sup>22</sup>

Dans une revue exhaustive de la littérature publiée en 2014, ST131 apparaît comme responsable de 20 à 72% des bactériémies à *E. coli* producteur de BLSE, de 21 à 70% des infections urinaires à *E. coli* producteur de BLSE, de 24 à 44% des infections urinaires à bactéries résistantes aux fluoroquinolones et représente 3 à 38% de l'ensemble des *E. coli* responsables d'infections<sup>22</sup>.

Les études menées sur de longues périodes entre 2000 et 2016 ont permis ainsi d'observer l'évolution des infections à *E. coli* ST131 dans différents pays :

- Aux Etats-Unis, Johnson *et al.* observèrent une augmentation significative de la prévalence de CTX-M-15 et des *E. coli* ST131 entre 2000-2004 et 2004-2009<sup>119</sup>.
- Au Canada, Peirano *et al.* ont décrit une augmentation de 37% des bactériémies à *E. coli* entre 2000 et 2011, concomitamment à l'augmentation des isolats producteurs de BLSE qui fût d'abord graduelle jusqu'en 2007 (4% des *E. coli* responsables de bactériémies), puis exponentielle, avec 14% de producteurs de BLSE parmi les *E. coli* responsables de bactériémies en 2010. Les *E. coli* ST131, qui représentaient de 0 à 44% des isolats producteurs de BLSE avant 2007 et 77% en 2009 et 2010, ont grandement contribué à cet accroissement exponentiel local des *E. coli* responsables de bactériémies<sup>120</sup>.

Des résultats similaires ont été observés (i) en Israël : augmentation concomitante, entre 2003 et 2009, des *E. coli* responsables de bactériémies communautaires et de la proportion

<sup>119</sup> J. R. Johnson *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **56**: 2364–2370, 2012.

<sup>120</sup> G. Peirano *et al.*, *Journal of Clinical Microbiology*, **50**: 294–299, 2012.

d'isolats producteurs de BLSE, et de *E. coli* ST131 en leur sein<sup>121</sup> (ii) en France : sur une période de 14 ans, augmentation des isolats cliniques de *E. coli* BLSE, avec 18% de ST131 sur l'ensemble de la période<sup>85</sup> (iii) en Angleterre : ST131, 2<sup>ème</sup> ST responsable de bactériémies (14 %) de 2001 à 2010, avec une augmentation importante de prévalence entre 2002 et 2008 (3% à 21%)<sup>122</sup> et (iv) au Canada sur une période plus récente (2006 à 2016) : augmentation significative des bactériémies à *E. coli* producteurs de BLSE (de 6 à 17%) corrélée à la proportion croissante de ST131 en leur sein (de 32 à 73%)<sup>123</sup>.

Au cours d'études transversales, des taux élevés (39 à 64%) de *E. coli* ST131 ont été décrits parmi les isolats cliniques producteurs de BLSE<sup>124-127</sup> alors que des taux faibles (17%) ont plus rarement été trouvés<sup>128</sup>. Par ailleurs, ST131 est très bien implanté dans la communauté de zones de haute endémicité d'entérobactéries productrices de BLSE comme l'Asie, où il est isolé dans un tiers, voire la moitié des bactériémies à *E. coli* BLSE<sup>129,130</sup>. Lorsque l'ensemble des infections à *E. coli* est pris en considération, la proportion de *E. coli* ST131 baisse drastiquement : de 4 à 12% des infections à *E. coli* en Europe, voire 6% des *E. coli* de phénotype sauvage responsables de bactériémies aux Pays-Bas, et de 17 à 27% des infections à *E. coli* aux Etats-Unis<sup>22,128,131</sup>. Ces résultats montrent que ce sont les souches productrices de BLSE qui prédominent au sein des *E. coli* ST131.

Certaines études ont caractérisé les clades d'appartenance des isolats de ST131 identifiés. Comme attendu, lorsque seuls les *E. coli* producteurs de BLSE sont étudiés, la majorité appartient au sous-clade C2, puis au sous-clade C1 et seulement quelques pourcents aux clades A et B<sup>85</sup>. Une répartition similaire est observée lorsque l'ensemble des *E. coli* sont étudiés<sup>100</sup>, avec une large prédominance du clade C. Une étude récente a comparé en parallèle les *E. coli* responsables de bactériémies sur deux continents (à Singapour et dans le Minnesota)<sup>132</sup>. Il est intéressant de remarquer que la prévalence des *E. coli* ST131 est la même dans les deux pays (environ 25% des

<sup>121</sup> D. Karfunkel *et al.*, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **32**: 513–521, 2013.

<sup>122</sup> M. J. Day *et al.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **71**: 2139–2142, 2016.

<sup>123</sup> S. Mineau *et al.*, *CMAJ open*, **6**: E580–E586, 2018.

<sup>124</sup> N. Begum *et al.*, *The Malaysian Journal of Pathology*, **38**: 241–249, 2016.

<sup>125</sup> I. Overdeest *et al.*, *Euro Surveill*: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = *European Communicable Disease Bulletin*, **21**: , 2016.

<sup>126</sup> M. J. Day *et al.*, *The Lancet Infectious Diseases*, , 2019.

<sup>127</sup> S. Flament-Simon *et al.*, *ECCMID -Paper Poster #P1204*, , 2019.

<sup>128</sup> J. Lafolie *et al.*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **44**: 466–468, 2014.

<sup>129</sup> Y. A. Kim *et al.*, *International Journal of Infectious Diseases*, **54**: 39–42, 2017.

<sup>130</sup> H.-C. Chung *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **56**: 618–622, 2012.

<sup>131</sup> I. T. M. A. Overdeest *et al.*, *Clinical Microbiology and Infection*, **21**: 570.e1–570.e4, 2015.

<sup>132</sup> S. M. Mendis *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **62**: , 2018.

isolats), mais que la répartition des isolats par clade et sous-clades est différente : une majorité d'isolats de sous-clade C2 (57%) à Singapour, suivi de ceux de sous-clade C1 (22%) et de clade A (11%), comparés à une grande majorité d'isolats de sous-clade C1 (75%) dans le Minnesota, suivi de ceux de sous-clade C2 (17%) et de clade A (8%)<sup>132</sup>. Dans une étude de Kallonen *et al.* qui caractérise des *E. coli* bactériémiques systématiquement collectés entre 2001 à 2012 en Angleterre, on peut voir, en considérant les caractéristiques spécifiques de chaque clade, que parmi les ST131, 73,8% sont de clade C, 16,5% de clade B et 8,2% de clade A<sup>133</sup>. Enfin une étude espagnole a montré que parmi les *E. coli* ST131 non producteurs de BLSE et responsables de bactériémies, 42,4% appartenaient au clade C, mais 36,4% appartenaient au clade B<sup>134</sup>. Toutes ces études montrent donc que, malgré la dominance du clade C, les clades A et B continuent de causer des infections.

Par ailleurs, il a été observé que la prévalence des souches de ST131 au sein des isolats cliniques de *E. coli* différaient en fonction de l'âge des patients, avec une prévalence significativement plus forte chez les personnes âgées<sup>100,135</sup>. Par exemple, *E. coli* ST131 représentait 14 à 28% des isolats cliniques de *E. coli* totaux dans une population de vétérans aux Etats Unis<sup>99,135</sup>, et plusieurs études ont montré que la proportion d'isolats de *E. coli* ST131 responsables d'infection urinaire augmentait avec l'âge des patients<sup>22,100</sup>. Les *E. coli* ST131 producteurs de CTX-M du groupe 9 (auquel appartiennent CTX-M-14 et CTX-M-27) ont été décrits comme majoritaires au sein des *E. coli* producteurs de BLSE responsables d'infections urinaires chez des enfants de moins de un an en Chine<sup>136</sup>, et dans une unité de soins intensifs de néonatalogie en Pologne où les *E. coli* ST131 comptaient pour 36% de l'ensemble des infections à *E. coli* et pour 64% des infections à *E. coli* producteurs de BLSE<sup>137</sup>. Ces résultats suggèrent une relation particulière entre les *E. coli* ST131, en particulier producteurs de BLSE, et les âges extrêmes chez l'Homme.

L'âge n'est pas l'unique facteur de risque associé aux infections à *E. coli* ST131. Il a également été observé que sur une population de vétérans américains, les infections à *E. coli* ST131 sont associées aux soins de longue durée<sup>100,138</sup>. En concordance avec ce résultat observé aux Etats-Unis, il a été mis en évidence en France que vivre dans un établissement de soins de longue durée était le seul

---

<sup>133</sup> T. Kallonen *et al.*, *Genome Research*, **27**: 1437–1449, 2017.

<sup>134</sup> I. Morales-Barroso *et al.*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **49**: 498–502, 2017.

<sup>135</sup> A. R. Manges *et al.*, *Epidemiology and Infection*, 1–7, 2018.

<sup>136</sup> M.-F. Cheng *et al.*, *The Pediatric Infectious Disease Journal*, **34**: 469–475, 2015.

<sup>137</sup> A. Chmielarczyk *et al.*, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **76**: 542–545, 2013.

<sup>138</sup> D. M. Drekonja *et al.*, *Open Forum Infectious Diseases*, **3**: ofw138, 2016.

facteur de risque associé au fait d'avoir une infection due à *E. coli* ST131 producteur de BLSE<sup>139</sup>. Enfin, plusieurs études ont fait état d'une association entre *E. coli* ST131 et les infections associées aux soins<sup>100,135,138</sup>.

Malgré des échecs de traitements plus fréquents avec ST131<sup>140</sup>, qui sont majoritairement expliqués par une résistance aux antibiotiques de première intention, les infections causées par *E. coli* ST131 ne semblent pas présenter une sévérité plus élevée que la moyenne des infections à ExPECs. En effet, le taux de mortalité et la gravité des sepsis dus à *E. coli* ST131 sont comparables à ceux des autres *E. coli*<sup>130,134,138,141</sup>. Au cours de plusieurs études ciblant des isolats cliniques d'*E. coli* consécutifs, il a été montré que les *E. coli* ST131 causaient d'avantage d'infections asymptomatiques, récurrentes ou persistentes<sup>100,138,142,143</sup>. Toutefois, l'association entre *E. coli* ST131 et récurrence des infections n'a pas été observée pour les *E. coli* ST131 responsables d'infections urinaires chez des femmes dans la communauté<sup>144,145</sup>.

#### ii. Portage digestif chez l'Homme

Parmi les raisons du succès global de ST131 pourraient figurer une capacité accrue à coloniser le tube digestif de l'Homme. Le tractus digestif est en effet le principal réservoir des ExPEC, mais rares sont les études qui ont exploré le portage d'isolats de *E. coli* ST131 sans se focaliser sur les souches productrices de BLSE. De ces rares études ressort que *E. coli* ST131 est présent en portage digestif chez l'Homme. En effet, *E. coli* ST131 est la population dominante dans le tube digestif de 7% à 10% de sujets sains vivant en Ile de France<sup>75,146</sup>. Un pourcentage similaire a été observé chez des sujets sains en Chine (6%) et un pourcentage plus faible chez des enfants (1%) et des femmes en âge de procréer (4%) en Australie<sup>147-149</sup>. Dans l'étude chinoise les souches de *E. coli* ST131 appartenaient au clade A alors que dans l'étude Française, 43% appartenaient au clade B et 57% au sous-clade C1<sup>150</sup>. Le portage de *E. coli* ST131 producteurs de BLSE dans la communauté a également été évalué aussi bien en France : 0,6% de la population générale, 1,6% des patients arrivant aux Urgences et 2,8% des

<sup>139</sup> M.-H. Nicolas-Chanoine *et al.*, PLoS ONE, **8**: e72191, 2013.

<sup>140</sup> F. Can *et al.*, Clinical Infectious Diseases, **60**: 523–527, 2015.

<sup>141</sup> L. López-Cerero *et al.*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **69**: 809–814, 2014.

<sup>142</sup> J. R. Johnson *et al.*, Clinical Infectious Diseases, **62**: 1529–1536, 2016.

<sup>143</sup> V. Tchesnokova *et al.*, Journal of Clinical Microbiology, **51**: 2991–2999, 2013.

<sup>144</sup> M. D. Ismail *et al.*, Journal of Global Antimicrobial Resistance, **13**: 81–84, 2018.

<sup>145</sup> Y. A. Kim *et al.*, BMC infectious diseases, **18**: 250, 2018.

<sup>146</sup> M.-H. Nicolas-Chanoine *et al.*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **68**: 562–568, 2012.

<sup>147</sup> T. Kudinha *et al.*, Journal of Clinical Microbiology, **51**: 3270–3276, 2013.

<sup>148</sup> Y.-M. Zhong *et al.*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **70**: 2223–2227, 2015.

<sup>149</sup> T. Kudinha *et al.*, The Pediatric Infectious Disease Journal, **32**: 543–548, 2013.

<sup>150</sup> M.-H. Nicolas-Chanoine *et al.*, BMC microbiology, **17**: 71, 2017.



enfants gardés en crèche, qu'en Chine, où 4% de la population générale sont porteurs<sup>64,146,151,152</sup>. Dans un contexte associé aux soins, les *E. coli* ST131 producteurs de BLSE ont été trouvés en portage chez 1,4% de patients hospitalisés en Suisse, chez 4,6% et 20% de résidents d'établissement d'hébergement pour personnes âgées dépendantes (EHPAD) en Allemagne<sup>153</sup> et au Portugal<sup>154</sup>, respectivement. Ces données indiquent des taux de portage plus élevés dans un contexte d'institutionnalisation<sup>155</sup>, ce qui est cohérent avec l'observation d'une prévalence plus forte des infections à *E. coli* ST131 producteurs de BLSE chez les personnes âgées<sup>99,100</sup>, ainsi que dans les infections associés aux soins<sup>99,100,135,138</sup>. Une récente étude a mis en évidence plusieurs caractéristiques associées à la colonisation intestinale par *E. coli* ST131 chez des personnes hospitalisées et les membres de leur famille : l'alitement et la présence d'une sonde urinaire étaient des facteurs de risque pour les patients hospitalisés, tandis que l'âge avancé et la consommation d'inhibiteurs de pompes à protons étaient des facteurs de risque pour les membres de la famille<sup>156</sup>.

En conclusion, le portage de *E. coli* ST131 producteur de BLSE est largement répandu dans la communauté et en milieu hospitalier<sup>157</sup>, avec 0,6 à 3,7% de personnes porteuses de dans la population générale<sup>146,152</sup>. Par ailleurs, l'ensemble des ST131, producteurs ou non de BLSE, colonise entre 26 et 44% des individus en milieu médicalisé et des enfants gardés en crèche<sup>64,153,155,158</sup>. Il est à noter que les *E. coli* ST131 non producteurs de BLSE constituent la population dominante intestinale de *E. coli* de 7% des sujets sains<sup>75</sup>.

### iii. Colonisation à long terme

Le succès des *E. coli* ST131 producteurs de BLSE en milieu médical pourrait être expliqué par sa plus grande capacité de colonisation sur le long terme. Cette hypothèse n'a jusqu'ici été vérifiée que dans un contexte de soins de longue durée, où les *E. coli* ST131 BLSE avaient une demi-vie estimée (durée à partir de laquelle la moitié de la population ne serait plus porteuse) en portage rectal (13 mois) significativement plus longue que celles des autres *E. coli* BLSE (2-3 mois)<sup>125</sup>. Cela n'a en revanche pas été strictement confirmé dans la population générale, chez qui la capacité de colonisation à long terme est effectivement observée pour les *E. coli* ST131 producteurs de BLSE, mais cette capacité est également observée pour l'ensemble des *E. coli* BLSE de groupes

---

<sup>151</sup> V. d. Lastours *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **60**: 6941–6944, 2016.

<sup>152</sup> B. Li *et al.*, *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **43**: 170–174, 2011.

<sup>153</sup> M. Arvand *et al.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68**: 2686–2688, 2013.

<sup>154</sup> C. Rodrigues *et al.*, *Epidemiology & Infection*, **145**: 3303–3306, 2017.

<sup>155</sup> M. T. Nüesch-Inderbinen *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, **19**: 362–369, 2013.

<sup>156</sup> I. Morales Barroso *et al.*, *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, **7**: 135, 2018.

<sup>157</sup> P. M. den Reijer *et al.*, *PLoS ONE*, **11**: e0150420, 2016.

<sup>158</sup> R. Izdebski *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**: 309–316, 2013.

phylogénétiques B2 et D<sup>159,160</sup>. Cependant, compte tenu qu'il a été démontré par Brisse *et al.* que les souches de *E. coli* du groupe B2 ne produisaient que très rarement des BLSE de type CTX-M, à l'exception de *E. coli* ST131, il y a tout lieu de penser que *E. coli* ST131 est principalement en cause dans le portage prolongé des *E. coli* producteurs de BLSE dans la communauté<sup>161</sup>.

Dans un article récent portant sur une cohorte de femmes sans infection urinaire documentée, le portage à long terme de *E. coli* ST131 résistants aux fluoroquinolones de clade C était significativement plus fréquent que celui d'autres *E. coli* résistants aux fluoroquinolones<sup>162</sup>.

#### iv. Transmissibilité de *E. coli* ST131

La capacité de transmission de *E. coli* ST131, qui pourrait en partie expliquer l'émergence de ce clone, a été explorée et de multiples études décrivent des transmissions de ST131 de personne à personne : (i) chez un nourrisson souffrant d'une arthrite septique à *E. coli* ST131 résistant aux fluoroquinolones dont la mère était porteuse<sup>163</sup>, (ii) chez deux sœurs vivants sous le même toit ayant déclaré deux infections sévères causées par la même souche de *E. coli* ST131 productrice de BLSE<sup>164</sup> et (iii) chez une femme déclarant un choc septique à *E. coli* ST131 BLSE après avoir rendu visite à son père, hospitalisé pour une infection urinaire grave causée par cette même souche<sup>165</sup>. Au sein d'une famille où deux des enfants avaient eu une infection urinaire à la même souche de *E. coli* ST131 BLSE, les *E. coli* présents en portage digestif chez tous les membres de la famille ont été étudiés pendant 4 mois : la souche la plus largement répandue (chez 5 membres sur 6) et la plus persistante était la souche de *E. coli* ST131 productrice de BLSE responsable de l'infection chez les deux enfants<sup>166</sup>. L'importante transmissibilité intrafamiliale de *E. coli* ST131 a de plus été confirmée par des techniques de séquençage du génome complet<sup>167</sup>.

*E. coli* ST131 semble également posséder une bonne transmissibilité en milieu institutionnel : partage d'une même souche ST131 productrice de BLSE en portage rectal par sept enfants d'une même crèche<sup>64</sup>. Cependant, des études suggèrent que la transmission entre personnes ou l'acquisition à partir d'une source commune de *E. coli* ST131 est plus fréquente dans le milieu

<sup>159</sup> S. B. Jørgensen *et al.*, PLOS ONE, **12**: e0173510, 2017.

<sup>160</sup> E. Titelman *et al.*, Clinical Microbiology and Infection, **20**: O508–515, 2014.

<sup>161</sup> S. Brisse *et al.*, Journal of Clinical Microbiology, **50**: 2974–2981, 2012.

<sup>162</sup> V. L. Tchesnokova *et al.*, Clinical Infectious Diseases, **ciz547**, 2019.

<sup>163</sup> J. Johnson *et al.*, The Pediatric Infectious Disease Journal, **29**: 473–475, 2010.

<sup>164</sup> R. C. Owens *et al.*, Journal of Clinical Microbiology, **49**: 3406–3408, 2011.

<sup>165</sup> P. T. Ender *et al.*, Journal of Clinical Microbiology, **47**: 3780–3782, 2009.

<sup>166</sup> T. Madigan *et al.*, Clinical Infectious Diseases, **61**: e5–12, 2015.

<sup>167</sup> J. R. Johnson *et al.*, Open Forum Infectious Diseases, **3**: ofw129, 2016.

domestique que dans le milieu hospitalier<sup>168,169</sup>.

Néanmoins, des réserves sont à apporter concernant la spécificité de cette capacité de transmissibilité accrue de *E. coli* ST131. En effet, le contact étroit entre personnes est un paramètre connu comme étant associé au partage multi-hôtes de souches de *E. coli*<sup>170,171</sup>. De plus, dans une étude néerlandaise portant sur la colonisation prolongée par *E. coli* ST131 dans un centre de soins de longue durée, il a été montré que le taux de transmission des *E. coli* ST131 producteurs de BLSE était comparable à celui des autres *E. coli* producteurs de BLSE<sup>125</sup>.

En conclusion, bien que les infections à *E. coli* ST131 producteurs de BLSE aient été associées aux soins et au fait de résider en centre de long séjour, les quelques investigations réalisées sur leur transmissibilité montrent que la transmission entre membres d'une même famille ou vivant sous le même toit est effective, efficace et donc nodale dans la dissémination des souches de *E. coli* ST131 résistantes aux antibiotiques.

#### v. ST131, BLSE et carbapénèmases

Concernant la résistance aux C3G par production de BLSE, de multiples études ont montré que CTX-M-15 était de loin la BLSE la plus répandue chez ST131. Toutefois, la production d'autres enzymes de types CTX-M ont été décrites, en particulier CTX-M-1, 14 et 27, mais aussi CTX-M-2, 3, 9, 10, 18, 24, 28, 32, 39, 52, 55, 61, 65 et 103<sup>22,124,148,154,172-181</sup>. Différentes BLSE autres que CTX-M ont également été documentées chez ST131 : des variants BLSE de SHV et plus rarement, des variants BLSE de TEM<sup>22</sup>.

L'apparition de la résistance aux carbapénèmes, antibiotiques de dernier recours, dans une bactérie communautaire telle que *E. coli* suscite de grandes inquiétudes au sein de la communauté médicale. Les NDM et les OXA-48-like sont les carbapénèmases les plus fréquemment produites par les isolats de *E. coli* en milieu hospitalier et dans la communauté, alors que les carbapénèmases

---

<sup>168</sup> M. Hilty *et al.*, *Clinical Infectious Diseases*, **55**: 967–975, 2012.

<sup>169</sup> E. Torres *et al.*, *Clinical Microbiology and Infection*, **24**: 618–623, 2018.

<sup>170</sup> S. Lietzau *et al.*, *BMC Infectious Diseases*, **6**: 119, 2006.

<sup>171</sup> S. Lietzau *et al.*, *Journal of Clinical Epidemiology*, **60**: 1149–1155, 2007.

<sup>172</sup> A. Giedraitienė *et al.*, *Infectious Diseases (London, England)*, **49**: 106–112, 2017.

<sup>173</sup> H. Kanamori *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **61**: , 2017.

<sup>174</sup> Y. Matsumura *et al.*, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **70**: 1639–1649, 2015.

<sup>175</sup> M. H. Namaei *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, **23**: 879–884, 2017.

<sup>176</sup> K. Kawamura *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, **24**: 1513–1520, 2018.

<sup>177</sup> C. C. Papagiannitsis *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, **21**: 74–84, 2015.

<sup>178</sup> S. A. Alsharapy *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, , 2018.

<sup>179</sup> M. H. Al-Agamy *et al.*, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **13**: 4, 2014.

<sup>180</sup> E. F. Badran *et al.*, *Journal of Medical Microbiology*, **65**: 137–141, 2016.

<sup>181</sup> R. Dziri *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, **22**: 399–403, 2016.

VIM, KPC et IMP sont moins fréquentes et majoritairement nosocomiales<sup>182</sup>. À travers le monde, les principaux réservoirs des carbapénèmases sont les suivants : *K. pneumoniae* et *E. coli* sur le sous-continent indien pour les NDM, *K. pneumoniae* et *E. coli* en Afrique du Nord et en Turquie pour les OXA-48 et *K. pneumoniae* aux Etats-Unis, Israël, Grèce et en Italie pour les KPC<sup>182</sup>. Le Centre européen de prévention et contrôle des maladies estimait le nombre d'infections à *E. coli* producteurs de carbapénèmases à environ 2 600 en Europe en 2015, parmi lesquels environ 140 morts sont imputables à la résistance aux antibiotiques<sup>118</sup>.

Etant donné l'important potentiel de dissémination de ST131, les épidémiologistes suivent avec attention les détections de *E. coli* ST131 producteurs de carbapénèmases à travers le monde. Le gène *bla<sub>NDM</sub>* fût tout d'abord identifié chez ST131 à Chicago puis à Paris chez des patients ayant voyagé en Inde<sup>183,184</sup>, puis en Chine et en Inde, où ST131 représente 28% des *E. coli* producteurs de carbapénèmases<sup>185,186</sup>. KPC a été trouvée chez des isolats de *E. coli* ST131 aux Etats-Unis, en France, en Irlande, en Bulgarie, à Taïwan<sup>22,187,188</sup>, en Chine où ces souches sont responsables d'épidémies<sup>189,190</sup> et en Italie dans des établissements de soins de longue durée<sup>191</sup>. Enfin, des isolats de *E. coli* ST131 producteurs de carbapénémase de type OXA-48 like ont été décrits au Royaume-Uni, en Irlande, Algérie, Espagne et Iran<sup>187,192</sup>. Sur 20 isolats de *E. coli* producteurs de KPC aux Etats Unis, 60% appartenaient au clone ST131, majoritairement de clade C, et le gène *bla<sub>KPC</sub>* était majoritairement porté par un plasmide IncFIIk<sup>193</sup>. L'étude la plus conséquente, menée sur 116 isolats cliniques de *E. coli* producteurs de carbapénémase provenant de différents continents, a montré que 35% de ces *E. coli* appartenaient au clone ST131 et que ces isolats de *E. coli* ST131 résistants aux carbapénèmes étaient significativement associés à une résistance aux fluoroquinolones, au gène *bla<sub>KPC</sub>*, et au clade C<sup>194</sup>. Pour le moment, la dissémination des ST131 producteurs de carbapénèmases reste limitée et n'a pas de commune mesure avec la diffusion des ST131 producteurs de BLSE, mais une surveillance étroite demeure indispensable.

<sup>182</sup> P. Nordmann *et al.*, *Clinical Microbiology and Infection*, **20**: 821–830, 2014.

<sup>183</sup> G. Peirano *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**: 2986–2988, 2011.

<sup>184</sup> R. A. Bonnin *et al.*, *PLOS ONE*, **7**: e34752, 2012.

<sup>185</sup> L.-H. Wang *et al.*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **48**: 41–45, 2016.

<sup>186</sup> A. Hussain *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58**: 7240–7249, 2014.

<sup>187</sup> A. J. Mathers *et al.*, *Clinical Microbiology Reviews*, **28**: 565–591, 2015.

<sup>188</sup> R. Markovska *et al.*, *Infectious Diseases (London, England)*, **49**: 429–431, 2017.

<sup>189</sup> J. C. Cai *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58**: 1146–1152, 2014.

<sup>190</sup> F. Zhang *et al.*, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **34**: 1263–1269, 2015.

<sup>191</sup> A. Piazza *et al.*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **901**: 77–89, 2016.

<sup>192</sup> Z. Hojabri *et al.*, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **36**: 1859–1866, 2017.

<sup>193</sup> J. A. O'Hara *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58**: 4234–4237, 2014.

<sup>194</sup> G. Peirano *et al.*, *Emerging Infectious Diseases*, **20**: 1928–1931, 2014.

vi. *E. coli* ST131 et la résistance plasmidique à la colistine

La colistine est un antibiotique de la famille des polymyxines, efficace contre les bactéries à Gram négatif. Découverte en 1950, cette molécule a été remise au goût du jour devant l'augmentation des Entérobactéries multirésistantes aux antibiotiques et productrices de carbapénèmases et est utilisée aujourd'hui lors d'infections graves causées par ces bactéries. Si la consommation de colistine est limitée chez l'Homme, elle est massive dans l'élevage animal<sup>195</sup>. Récemment, l'émergence de la résistance à la colistine codée par un gène plasmidique, « mobilized colistin resistance » (*mcr-1*), a été identifiée en Chine<sup>196</sup>. Ce gène a depuis été décrit au sein de plusieurs espèces bactériennes isolées d'animaux, de nourriture d'origine animale, de souches humaines et environnementales à travers le monde<sup>197</sup>. Le gène *mcr-1* semble s'être propagé grâce à un efficace transfert horizontal *via* un nombre limité de systèmes d'incompatibilités plasmidiques : IncI2, IncX4, et IncHI2<sup>198</sup>. Comme commenté précédemment, des isolats *E. coli* ST131 porteurs de plasmides IncX et IncH ont déjà été décrits, et des isolats de *E. coli* ST131 porteur du gène *mcr-1* ont récemment été identifiés à la fois comme pathogènes (infection urinaire, péritonite, bactériémie, etc.) chez l'Homme (enfants et adultes)<sup>199-204</sup> et le porc<sup>205</sup>, et comme colonisateur du tube digestif chez l'Homme et le porc<sup>201,206</sup>. Le typage du gène *fimH* a été réalisé chez deux isolats cliniques ST131 porteurs de *mcr* (infection urinaire chez un enfant en Arabie Saoudite<sup>204</sup> et pyélonéphrite chez un adulte danois de retour d'un voyage en Thaïlande<sup>203</sup>). Dans les deux cas, les isolats avaient l'allèle *fimH22* (clade B), et le gène *mcr* était porté par un plasmide IncHI2, type de plasmide décrit comme significativement associé au clade B<sup>93</sup>.

vii. Le clade A : *E. coli* O16:H5-ST131

Ce variant le plus ancestral de ST131 a été peu décrit dans la littérature. Néanmoins, ce clade est

---

<sup>195</sup> B. Catry *et al.*, International Journal of Antimicrobial Agents, **46**: 297–306, 2015.

<sup>196</sup> Y.-Y. Liu *et al.*, The Lancet. Infectious Diseases, **16**: 161–168, 2016.

<sup>197</sup> L. Dortet *et al.*, Journal des Anti-infectieux, **18**: 139–159, 2016.

<sup>198</sup> S. Matamoros *et al.*, Scientific Reports, **7**: 15364, 2017.

<sup>199</sup> S.-C. Kuo *et al.*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **71**: 2327–2329, 2016.

<sup>200</sup> V. Ortiz de la Tabla *et al.*, International Journal of Antimicrobial Agents, **49**: 115–116, 2017.

<sup>201</sup> Y. Wang *et al.*, The Lancet Infectious Diseases, **17**: 390–399, 2017.

<sup>202</sup> H. Hasman *et al.*, Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin, **20**: , 2015.

<sup>203</sup> L. Roer *et al.*, Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin, **22**: , 2017.

<sup>204</sup> M. F. Alghoribi *et al.*, Microbiology Resource Announcements, **8**: , 2019.

<sup>205</sup> I. García-Meniño *et al.*, Frontiers in Microbiology, **9**: 2659, 2018.

<sup>206</sup> D. Faccione *et al.*, Journal of Global Antimicrobial Resistance, **18**: 160–162, 2019.

responsable de 2 à 12% des infections à *E. coli* ST131 en Europe<sup>207-209</sup>, aux Etats-Unis<sup>73</sup>, au Japon<sup>61</sup> et en Australie<sup>60</sup>. Il a également été documenté en portage rectal chez des enfants dans des crèches françaises<sup>64</sup> et dans la population générale en Chine<sup>148</sup>. Le clade A est associé à la production de BLSE CTX-M-14<sup>93</sup>, et une souche O16:H5-ST131 a récemment été décrite comme productrice de carbapénèmase OXA-48 en Espagne<sup>209</sup>.

#### viii. Le cluster C1-M27

Ce cluster appartenant au sous-clade C1 a récemment émergé. Initialement décrit en Asie avec une première souche isolée au Japon en 2004<sup>82</sup>, il est aujourd'hui mis en évidence sur plusieurs continents<sup>210</sup>. Au Japon, il est devenu le clone ST131 dominant depuis 2009<sup>81</sup>, représentant 36 à 42% des ST131 producteurs de BLSE en portage<sup>81,176</sup>, et près d'un tiers des *E. coli* producteurs de BLSE responsables de bactériémies<sup>211</sup>. En Europe, le cluster C1-M27 a été trouvé en portage chez des enfants<sup>64,88,91</sup>, des adultes hospitalisés<sup>89</sup> et également dans des infections extra-intestinales chez l'Homme et les animaux domestiques<sup>87,92,127</sup>. En Allemagne, ce cluster est même pressenti comme l'éventuel remplaçant du sous-clade C2. En effet, une étude rétrospective a montré une incidence croissante des isolats cliniques C1-M27, passant de 0% en 2009 à 45% en 2016, suggérant une émergence de ce cluster ultérieure en Europe à celle observée au Japon<sup>86</sup>.

<sup>207</sup> B. Olesen *et al.*, *Journal of Clinical Microbiology*, **51**: 1779–1785, 2013.

<sup>208</sup> G. Dahbi *et al.*, *International journal of medical microbiology*, **304**: 1247–1257, 2014.

<sup>209</sup> M. de Toro *et al.*, *Scientific Reports*, **7**: 12103, 2017.

<sup>210</sup> J. D. Pitout *et al.*, *F1000Research*, **6**: 195, 2017.

<sup>211</sup> Y. Komatsu *et al.*, *PLoS ONE*, **13**: e0202276, 2018.

## B. ST131 et les animaux de compagnie

*E. coli* fait communément partie du microbiote intestinal des mammifères et, dans une moindre mesure, de celui des oiseaux. Comme chez l'Homme, les *E. coli* de groupes phylogénétiques B2 et D sont la cause la plus fréquente d'infections extra-intestinales chez le chien et le chat, en particulier d'infections urinaires<sup>212</sup>. De plus, en médecine vétérinaire comme en médecine humaine, la résistance aux antibiotiques représente une menace, en particulier dans les zoonoses. Les animaux de compagnie pourraient jouer un rôle important en tant que réservoir de bactéries résistantes ou de gènes de résistance, étant donné leur exposition aux antibiotiques et leurs contacts étroits avec l'Homme. Ce contact peut à l'inverse faire de l'Homme un potentiel réservoir de la résistance aux antibiotiques pour les bactéries pathogènes chez les animaux de compagnie. Les quatre ST des *E. coli* pathogènes principalement incriminés chez l'Homme (STs 69, 73, 95 et 131) ont été également incriminés chez les animaux de compagnie, notamment le chien et le chat<sup>213-217</sup>, mais de ces quatre STs, ST131 est le plus faiblement représenté en portage digestif chez le chien et le chat (1 et 0,3% de l'ensemble des *E. coli* isolés, respectivement)<sup>218</sup>.

Les études portant sur *E. coli* ST131 en tant que pathogène chez le chien et le chat montrent qu'il est responsable de 5,6 et de 36 à 54% des infections à *E. coli* producteur de BLSE en Europe et au Japon, respectivement<sup>213,219,220</sup>, de 7,2% des infections à *E. coli* résistants aux fluoroquinolones en Australie<sup>221</sup>, de 15% (dont 72% de clade non-C) des infections urinaires à *E. coli* au Portugal<sup>222</sup> et de 7,8% des infections urinaires en Suisse<sup>223</sup>. Dans une récente étude canadienne menée sur des isolats cliniques et fécaux de *E. coli* producteurs de BLSE chez le chien, le poulet, le porc, le bovin et le cheval, des *E. coli* ST131 ont été identifiés uniquement chez le chien<sup>224</sup>. Des travaux récents menés en France attestent d'une augmentation de la prévalence de ST131 parmi les *E. coli* producteurs de BLSE ou de céphalosporinase AmpC responsables d'infections chez le chien et le chat : passage de

---

<sup>212</sup> T. A. Hutton *et al.*, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **30**: 64–70, 2018.

<sup>213</sup> C. Ewers *et al.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **65**: 651–660, 2010.

<sup>214</sup> C. Ewers *et al.*, *Clinical Microbiology and Infection*, **18**: 646–655, 2012.

<sup>215</sup> J. R. Johnson *et al.*, *Journal of Clinical Microbiology*, **46**: 417–422, 2008.

<sup>216</sup> S. Guo *et al.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68**: 1025–1031, 2013.

<sup>217</sup> X. Liu *et al.*, *PLOS ONE*, **10**: e0143335, 2015.

<sup>218</sup> J. A. Bourne *et al.*, *PLoS ONE*, **14**: e0212867, 2019.

<sup>219</sup> K. Kawamura *et al.*, *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **23**: 1059–1066, 2017.

<sup>220</sup> K. Harada *et al.*, *Microbiology and Immunology*, **56**: 480–485, 2012.

<sup>221</sup> J. L. Platell *et al.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **65**: 1936–1938, 2010.

<sup>222</sup> A. Belas *et al.*, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **74**: 266–269, 2019.

<sup>223</sup> A. L. Zogg *et al.*, *Veterinary Microbiology*, **216**: 79–84, 2018.

<sup>224</sup> A. Cormier *et al.*, *Veterinary Microbiology*, **231**: 71–75, 2019.

5,6% en 2008-2009 à 20,7% entre 2010 et 2016<sup>92</sup>.

La transmission de *E. coli* ST131 entre des humains et leurs animaux de compagnie a été plusieurs fois documentée : (i) partage d'une même souche de *E. coli* ST131 entre humains, chiens et chats d'une même maison<sup>167,225</sup> (ii) infections urinaires causées par la même souche de *E. coli* ST131 chez trois animaux d'une même famille aux Etats-Unis, suggérant un partage entre eux de cette souche<sup>225</sup> et (iii) des similitudes génomiques, sur les profils de résistance et de virulence ont été observées entre souches ST131 humaines et d'animaux de compagnie<sup>59</sup>. Les animaux de compagnie pourraient donc jouer un rôle dans l'agrandissement du réservoir et les dynamiques de transmission de ce clone. Néanmoins, plusieurs études ne supportent pas cette hypothèse du fait de l'absence de similitude entre les pulsotypes des souches ST131 humaines et de celles d'animaux domestiques<sup>67,226</sup>, et de la présence d'une association négative entre infection à *E. coli* ST131 et exposition à des chats domestiques<sup>135</sup>.

---

<sup>225</sup> J. R. Johnson *et al.*, *Journal of Clinical Microbiology*, **47**: 3721–3725, 2009.

<sup>226</sup> C. Pomba *et al.*, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **69**: 271–273, 2014.



### C. ST131, animaux d'élevage et aliments

Le lien direct entre l'utilisation des antibiotiques dans l'élevage animal et l'émergence de résistance aux antibiotiques a été démontré chez des pathogènes intestinaux comme *Salmonella enterica* et *Campylobacter* sp., mais également chez des pathogènes opportunistes comme *Staphylococcus aureus* et *Clostridium difficile*<sup>110</sup>. Ce risque potentiel a été récemment illustré chez *E. coli* par la découverte du gène plasmidique de résistance à la colistine *mcr-1* chez des entérobactéries, initialement dans des élevages de porcs chinois, puis dans des isolats cliniques chez l'Homme, résistance a priori sélectionnée au sein de ces élevages où cet antibiotique est massivement utilisé (cf chapitre dédié). À ce jour en France, les céphalosporines de troisième et quatrième générations sont utilisées chez les bovins, les chevaux, les porcs et les carnivores domestiques, les fluoroquinolones chez les bovins, les volailles, les lapins, les porcs et les carnivores domestiques, et la colistine surtout chez les volailles, les porcs et les bovins, avec toutefois une consommation en forte baisse depuis 2015<sup>227</sup>.

Relativement peu d'études ont exploré la présence de *E. coli* ST131 chez les animaux d'élevage. ST131 a été décrit comme responsable d'infection gastro-intestinale chez le porc avec des souches productrices de BLSE ou porteuses du gène de résistance à la colistine *mcr-1*<sup>205,228</sup> ainsi que chez le poulet (0,2-1,5% des isolats de *E. coli*)<sup>229</sup>. *E. coli* ST131 semble globalement peu prévalent ou peu pathogène chez les animaux d'élevage car plusieurs études menées sur des cheptels de bovins, porcs et volailles n'ont trouvé aucun ST131 sur l'ensemble des isolats cliniques de *E. coli*, producteurs ou non de BLSE<sup>224,228</sup>. En portage, *E. coli* ST131 a été principalement identifié chez la volaille en Espagne et Italie (de 0,9-1,8% des isolats de *E. coli* de fiente de poulets et dindes)<sup>229,230</sup> ainsi que chez le porc au Danemark<sup>231</sup> et en Argentine, avec une souche porteuse du gène *mcr-1*<sup>206</sup>. Les gènes de BLSE majoritairement identifiés dans la littérature chez les souches isolées d'animaux d'élevage sont du groupe CTX-M-9 auquel appartiennent notamment CTX-M-14 et CTX-M-27, permettant d'exclure a priori le sous-clade C2 de cette niche épidémiologique.

Pour ce qui est de la nourriture d'origine animale, les *E. coli* ST131 semblent être également isolés de manière peu fréquente, hormis les isolats appartenant au clade B : (i) un seul isolat de *E.*

---

<sup>227</sup> D. Urban *et al.*, Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, 2018,

<sup>228</sup> A.-K. Schink *et al.*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **68**: 1741–1749, 2013.

<sup>229</sup> A. Mora *et al.*, Applied and Environmental Microbiology, **76**: 6991–6997, 2010.

<sup>230</sup> M. Giufrè *et al.*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **67**: 860–867, 2012.

<sup>231</sup> M. Trobos *et al.*, Microbiology, **155**: 831–836, 2009.

*E. coli* ST131 non producteur de BLSE et sensible aux fluoroquinolones au sein de 417 échantillons de viande de poulet crue au détail au Québec<sup>232</sup> (ii) 7% des échantillons de viande de poulet crue positifs à *E. coli* ST131 en Espagne<sup>229</sup>, ces souches possédant toutes le gène *ibeA*, spécifique du clade B<sup>233</sup>, et certaines étant productrices de CTX-M du groupe 9 (iii) 15,3% de *E. coli* ST131 au sein des *E. coli* isolés d'échantillons de viande crue de poulet, de dinde et de porc aux Etats Unis, dont 96% appartenaient au clade B<sup>110</sup> (iv) enfin, 3,8% de *E. coli* ST131 de clade C au sein des isolats de *E. coli* producteurs de BLSE et résistants aux fluoroquinolones isolés de viande de poulet crue en Italie<sup>234</sup>.

Les souches de clade B semblent avoir une capacité particulière à coloniser la volaille et à contaminer sa viande. De plus, plusieurs publications font état de similarités quant aux pulsotypes, plasmides Col, et autres marqueurs entre des souches de clade B isolées de volaille et de viande de volaille et celles isolées de prélèvement cliniques humains, faisant suspecter la volaille d'être une des sources potentielles de *E. coli* ST131 de clade B chez l'Homme<sup>110,229,232</sup>. Une possible contamination humaine au cours du processus de production de la viande de volaille doit cependant être considérée, bien qu'il ait été prouvé que la présence de *E. coli* sur de la viande de volaille soit en grande partie une conséquence de la contamination de cette viande par la flore fécale du poulet lui-même<sup>235</sup>, et qu'une association claire ait été trouvée entre des souches ST131 issues de l'alimentation et celles issues d'animaux d'élevage<sup>67</sup>. Toutefois, deux études ne s'intéressant qu'aux souches résistantes aux C3G n'ont pas trouvé de similarités entre souches d'origine animales et souches humaines, voire pas de ST131 du tout chez l'animal<sup>236,237</sup>. Finalement, une étude approfondie de Johnson *et al.* montre que les pulsotypes de *E. coli* ST131 sont essentiellement sources spécifiques, concluant alors que la nourriture et les animaux d'élevage ne sont pas des sources majeures de *E. coli* ST131 pour l'Homme<sup>67</sup>. De plus, une récente étude anglaise a tenté de déterminer la contribution de la chaîne alimentaire dans la dissémination des *E. coli* producteurs de BLSE chez l'Homme<sup>126</sup>. Pour cela, les isolats de *E. coli* producteurs de BLSE responsables de bactériémies chez l'Homme ont été typés et comparés aux isolats de *E. coli* producteurs de BLSE isolés à partir de fèces humaines, de lisier de ferme et de produits alimentaires vendus au détail de la même région. Comme attendu, *E. coli* ST131 producteur de BLSE est le ST majoritaire décrit dans les bactériémies et les fèces humaines, mais il est minoritaire, voire absent des prélèvements

<sup>232</sup> C. Vincent *et al.*, *Emerging Infectious Diseases*, **16**: 88–95, 2010.

<sup>233</sup> J. Blanco *et al.*, *Journal of Clinical Microbiology*, **51**: 3358–3367, 2013.

<sup>234</sup> A. Ghodousi *et al.*, *International Journal of Food Microbiology*, **228**: 10–13, 2016.

<sup>235</sup> B. Vangchhia *et al.*, *Environmental Microbiology*, **20**: 1350–1361, 2018.

<sup>236</sup> H. Dhanji *et al.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **65**: 2534–2537, 2010.

<sup>237</sup> A. Tóth *et al.*, *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica*, **60**: 175–185, 2013.

vétérinaires et de produits alimentaires, suggérant que ces réservoirs jouent un rôle mineur dans la diffusion de ce clone.

On observe pour l'ensemble des ExPECs humains la même tendance que pour ST131 : parmi les viandes, seules celle de volaille, voire de porc, peuvent être considérées comme de potentiels réservoirs d'ExPEC<sup>238</sup>. Il a d'ailleurs été démontré que des souches humaines ExPECs introduites dans des modèles de pathologies aviaires se comportaient comme des APECs, et *vice versa*<sup>238</sup>. Au vu des résultats contradictoires des études menées sur l'ensemble des ST131 et de celles concernant le clade B uniquement, il semblerait que la volaille soit un potentiel réservoir des *E. coli* ST131, mais seulement pour le clade B.

---

<sup>238</sup> A. R. Manges., *Clinical Microbiology and Infection*, **22**: 122–129, 2016.

#### D. ST131 et les animaux sauvages

Les animaux sauvages pourraient être des vecteurs sous-estimés de la résistance aux antibiotiques. *E. coli* ST131 a en particulier été identifié en portage chez des oiseaux migrateurs<sup>239-242</sup> (grands cormorans, mouettes et goélands argentés) en Russie, au Portugal et en Europe centrale, impliquant potentiellement un haut risque de dissémination du fait du mode de vie de ces oiseaux. Plus étonnant encore, des isolats de *E. coli* ST131 ont récemment été mis en évidence par une équipe espagnole dans un écosystème relativement préservé de l'Homme : l'Antarctique<sup>104</sup>. Ils décrivent ainsi la présence de sept isolats ST131, six de clade B et un de clade A, en portage digestif chez des phoques, des otaries et des éléphants de mer, en notant que les pulsotypes de ces souches animales présentaient de grandes similarités avec les pulsotypes de souches d'origine humaine. Par ailleurs, des souches de *E. coli* ST131 productrices de BLSE ont été décrites en portage chez des espèces animales ayant des contacts plus rapprochés avec l'Homme comme les corbeaux, les rats urbains<sup>243,244</sup>, et plus récemment les mouettes en Australie<sup>245</sup>. L'analyse détaillée des souches de portage chez les mouettes a montré que 17% des *E. coli* résistants aux fluoroquinolones et/ou porteurs de BLSE appartenaient au clone ST131, dont 31% appartenaient au sous-clade C1 *stricto sensu*, 19% au cluster C1-M27, 29% au sous-clade C2 et 21% au clade A.

<sup>239</sup> J. Hernandez *et al.*, Environmental Microbiology Reports, **2**: 329–332, 2010.

<sup>240</sup> D. Tausova *et al.*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **67**: 1103–1107, 2012.

<sup>241</sup> R. R. Simões *et al.*, Emerging Infectious Diseases, **16**: 110–112, 2010.

<sup>242</sup> A. R. Varela *et al.*, Journal of Global Antimicrobial Resistance, **3**: 286–289, 2015.

<sup>243</sup> I. Jamborova *et al.*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **62**: , 2018.

<sup>244</sup> S. Guenther *et al.*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **65**: 582–584, 2010.

<sup>245</sup> S. Mukerji *et al.*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **74**: 2566–2574, 2019.

## E. ST131 et l'environnement

Comme nous venons de le voir, le portage intestinal de *E. coli* ST131 producteur de BLSE est fréquent chez l'Homme tant en milieu hospitalier que dans la communauté, et n'est pas dénué d'importance dans le tractus digestif des animaux d'élevage, voire sauvages. Tous ces déchets humains ou animaux vecteurs de *E. coli* ST131 sont déversés dans l'environnement, soit directement, soit après traitement (stations d'épurations des eaux usées) *via* l'utilisation des boues d'épuration comme fertilisants<sup>246,247</sup>.

Des isolats ST131 ont été détectés dans les eaux usées en République Tchèque, Allemagne, Angleterre, Norvège, aux Pays Bas, au Portugal, en Guadeloupe, au Canada et au Japon<sup>83,115,248-253</sup>. La présence de *E. coli* ST131 a, par ailleurs, été décrite en milieu naturel, dans des rivières en Espagne et au Japon<sup>254,255</sup>, dans des sources en Chine et au Liban<sup>256,257</sup>, et observée jusque dans des sédiments côtiers et de l'eau de mer en Antarctique<sup>258</sup>.

Bien que la majorité des études s'intéressent uniquement aux *E. coli* producteurs de BLSE, certaines s'intéressant à tous les *E. coli* ont décrit le clade d'appartenance des ST131 isolés de l'environnement : isolats de clade A, sous-clade C1 et du cluster C1-M27 dans des eaux usées au Japon<sup>83</sup>, 63% de clade A et 29% de clade B dans des eaux usées au Canada<sup>253</sup>, et isolats de sous-clade C2 et du cluster C1-M27 pour les ST131 producteurs de BLSE isolés dans des eaux usées en République Tchèque<sup>243</sup>.

Deux études incriminent l'Homme comme principale source des souches de *E. coli* ST131 isolées dans l'environnement<sup>67,243</sup>.

En conclusion, ST131 est estimé être le ST le plus répandu parmi les ExPEC sur tous les continents depuis 2000, tout en sachant qu'une étude récente a mis en évidence une surestimation

---

<sup>246</sup> G. Zarfel *et al.*, *Environmental Pollution*, **173**: 192–199, 2013.

<sup>247</sup> L. Jakobsen *et al.*, *Environment International*, **34**: 108–115, 2008.

<sup>248</sup> S. Guyomard-Rabenirina *et al.*, *PloS One*, **12**: e0173155, 2017.

<sup>249</sup> M. Dolejska *et al.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **66**: 2784–2790, 2011.

<sup>250</sup> S. B. Jørgensen *et al.*, *PloS One*, **12**: e0186576, 2017.

<sup>251</sup> V. Calhau *et al.*, *Journal of Water and Health*, **13**: 311–318, 2015.

<sup>252</sup> G. C. A. Amos *et al.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **69**: 1785–1791, 2014.

<sup>253</sup> T. Finn *et al.* *ECCMID -Paper Poster #P1456- The distribution of Escherichia coli sequence type 131 in wastewater in Calgary, Canada*. Amsterdam, 2019.

<sup>254</sup> M. Colomer-Lluch *et al.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68**: 758–765, 2013.

<sup>255</sup> R. Gomi *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, **83**: , 2017.

<sup>256</sup> S. Li *et al.*, *Letters in Applied Microbiology*, **61**: 544–548, 2015.

<sup>257</sup> M. Diab *et al.*, *Veterinary Microbiology*, **217**: 97–103, 2018.

<sup>258</sup> M. L. Power *et al.*, *Environmental Pollution*, **215**: 58–65, 2016.

du poids des infections à *E. coli* ST131, due à un biais de sélection, compte tenu que les critères d'inclusion des études sont fréquemment basés sur la résistance aux antibiotiques<sup>259</sup>.

Bien que les diverses études épidémiologiques qui viennent d'être présentées aient rarement poussé la caractérisation des souches ST131 jusqu'au niveau des clades, une certaine hétérogénéité de niches pour les clades A, B et C de ST131 semble exister. En dépit de l'explosion du clade C dans les prélèvements cliniques humains au tout début des années 2000, les analyses phylogénétiques calibrées sur le temps<sup>76,78</sup> et les études épidémiologiques des potentiels réservoirs du clone ST131 témoignent de la persistance des trois clades, suggérant une évolution propre de chacun d'eux. Mc Nally *et al.* montrent que les gènes accessoires de faible fréquence, véhiculés par des éléments majeurs de l'évolution des sous-clades B et de la clade C<sup>78</sup> que sont les phages, les plasmides ou d'autres éléments génétiques mobiles, diffèrent entre le clade A et les clades B/C. Cette différence suggère que les trois clades de ST131 sont exposés à des réservoirs de plasmides et de phages différents et ne partagent que rarement la même niche écologique au même moment<sup>260</sup>.

Par ailleurs, la prévalence de colonisation et d'infection à ST131 étant plus importante chez les hôtes humains que chez les animaux, il semblerait que l'Homme soit le principal réservoir de ce pathogène, suggérant en conséquence que la pandémie de *E. coli* ST131 serait principalement un phénomène d'origine humaine.

---

<sup>259</sup> A. R. Manges *et al.*, *Clinical Microbiology Reviews*, **32**: e00135–18, 2019.

<sup>260</sup> A. McNally *et al.*, *mBio*, **10**: e00644–19, 2019.

### III. Les clefs du succès du clade C du clone O25b:H4 ST131

Les études ciblant *E. coli* O25b:H4 ST131 depuis sa découverte en 2007 se sont très majoritairement concentrées, sans longtemps le savoir, sur les isolats du clade C (tous porteurs de résistances aux antibiotiques), car c'était l'émergence et la diffusion de *E. coli* multirésistants aux antibiotiques qui mobilisaient l'intérêt et la crainte. Toutefois, quelques études récentes ont montré que des isolats membres du clade B, ancêtre du clade C, ont depuis l'émergence de ce dernier continué de persister dans le monde entier, tant en portage rectal chez l'Homme et l'animal que comme ExPEC<sup>85,133,134,151</sup>.

Qu'est-ce qui a fait le succès épidémiologique du clade C au sein des *E. coli* O25b:H4 ST131 ? Ce succès ne peut être expliqué par un taux de mutation élevé, car la vitesse d'évolution moléculaire estimée de ST131 est de 1 mutation par génome et par an, ce qui est un taux similaire au taux moyen chez *E. coli*<sup>93</sup>. Quelles sont alors les clefs du succès du clade C de *E. coli* ST131 comparé au clade B ? Serait-ce la plus large résistance du clade C aux antibiotiques, une plus grande virulence, une meilleure capacité à former du biofilm, à coloniser le tractus intestinal et/ou urinaire ? Les chapitres suivants explorent les réponses déjà apportées sur ces sujets, au cœur desquels s'inscrivent nos travaux.

### III.1. Fitness et *E. coli* ST131

En 1859, Charles Darwin introduisit la notion de sélection naturelle dans l'origine des espèces : « principe par lequel chaque légère variation d'un caractère, si utile, est préservée »<sup>261</sup>. Plus tard, Herbert Spencer parlera de « survival of the fittest » : qui symbolise la survie de la forme phénotypique ou génotypique qui aura engendré le plus de copie d'elle-même dans les générations successives<sup>262</sup>. Rapporté au monde de la bactériologie, le fitness peut se définir comme la capacité d'une bactérie à croître et se propager dans une population hôte<sup>263</sup>.

#### A. Méthodes de mesure du fitness

La façon la plus simple d'étudier le fitness d'une souche bactérienne au laboratoire est d'analyser, *via* des expériences de croissance *in vitro*, les paramètres issus des courbes de croissance mesurées au cours d'un cycle bactérien (phase de latence, phase de croissance exponentielle et phase stationnaire). Le plus exploité de ces paramètres est le taux de croissance maximum : temps auquel le taux de croissance atteint son maximum. Ce taux est robuste car variant peu selon la position du puits dans lequel la croissance est mesurée (lors de l'utilisation de microplaques) et étant peu affecté par la forme exacte de la courbe, contrairement à la densité optique finale, dont la valeur dépend de la position du puits, et au temps de latence, temps nécessaire à la bactérie pour passer de la phase de latence à la phase exponentielle, dont la valeur dépend de la concentration initiale de bactérie et de la technique de dilution utilisée<sup>264</sup>. Le taux maximum de croissance atteint par une souche dans un milieu donné est probablement un bon témoin de son adaptation à un environnement abiotique, mais il ne traduit pas la complexité des interactions avec d'autres souches et la concurrence bactérienne observée dans la nature en conditions commensales ou pathogènes. Le fitness est en effet une caractéristique complexe qui varie avec l'environnement et les compétiteurs présents. Par conséquent, des modèles *in vivo* chez l'animal ont été utilisés pour étudier le fitness bactérien, en particulier la colonisation intestinale chez la souris, modèle bien établi pour déterminer le fitness des entérobactéries<sup>265</sup>. Néanmoins, ces modèles *in vitro* et *in vivo* offrent une résolution trop faible

<sup>261</sup> C. Darwin. *On the origin of species by means of natural selection, or, The preservation of favoured races in the struggle for life* /. London : John Murray, 1859.

<sup>262</sup> H. Spencer. *The principles of biology. Tome 1 / by Herbert Spencer*, 1864.

<sup>263</sup> M. Diard *et al.*, *FEMS microbiology reviews*, **41**: 679–697, 2017.

<sup>264</sup> A. Bleibtreu *et al.*, *Infection and Immunity*, **81**: 2733–2742, 2013.

<sup>265</sup> P. S. Cohen *et al.*, *Infection and Immunity*, **40**: 62–69, 1983.



pour permettre une bonne estimation du fitness. Cette résolution peut être augmentée par de nombreuses répétitions de la même expérience, qui est un procédé lourd, posant des problèmes éthiques en ce qui concerne l'expérimentation *in vivo*. Une option privilégiée pour améliorer la résolution est la mise en compétition des souches bactériennes, qui est une technique de mise en œuvre simple, permettant par ailleurs la mise en évidence de différences fines sélectionnées dans la nature. En revanche, si l'on considère le fitness comme la capacité d'une bactérie à se propager dans une population hôte, cette notion est plus difficile à étudier au laboratoire. En effet ceci nécessite de prendre en compte à la fois des paramètres de l'état de santé de l'hôte, l'exploitation de l'hôte par la bactérie (virulence, mortalité induite, etc.) mais également la capacité de transmission de la bactérie au reste de la population, autant de paramètres qui relèvent davantage d'investigations épidémiologiques que d'expérimentations au laboratoire.

## B. Fitness et résistance

Chez *E. coli* O25b:H4 ST131, le fitness a principalement été étudié au regard de la résistance aux antibiotiques, facteur suspecté être à l'origine de la domination mondiale de ce clone parmi les souches cliniques de *E. coli*<sup>266</sup>. En effet, une résistance stable à de nombreuses familles d'antibiotiques n'avait jamais été observée chez les isolats du groupe phylogénétique B2, auquel ST131 appartient<sup>161</sup>. L'expansion clonale de souches résistantes n'est pas spécifique à *E. coli* puisqu'aussi décrite chez d'autres espèces bactériennes telles que *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*<sup>267</sup>. La modélisation de l'évolution de la résistance au sein d'une population d'hôte structurée, réalisée par Blanquart *et al.*<sup>268</sup>, décrit comment un mutant résistant arrive à émerger dans une population à l'équilibre. Le fait que la souche résistante colonise mieux les hôtes sous antibiotiques alors que la souche sensible colonise mieux les hôtes non traités entraîne une coexistence des deux populations bactériennes, puisqu'elles optent chacune pour des stratégies et des niches différentes. La répartition de ces deux souches dans la population dépend alors de la capacité de transmission de la bactérie ainsi que des antibiotiques potentiellement reçus par la population. Si le taux de transmission de la bactérie entre individus est faible, cela permet le maintien de la coexistence des deux souches dans la population, avec un développement local de chacune d'elles au sein de l'environnement qui lui est favorable. À l'inverse, l'émergence de la souche résistante sera favorisée soit de manière globale, par un fort taux de transmission dans

---

<sup>266</sup> A. J. Mathers *et al.*, *Advances in Applied Microbiology*, **90**: 109–154, 2015.

<sup>267</sup> F. Blanquart., *Evolutionary Applications*, **12**: 365–383, 2019.

<sup>268</sup> F. Blanquart *et al.*, *Journal of the Royal Society, Interface*, **15**: , 2018.

la population et des traitements antibiotiques courts et séquentiels, soit de manière localisée, au cœur des foyers de transmission élevée, lorsque le taux de transmission est hétérogène. Pour *E. coli* ST131, les facteurs de risques reconnus d'infection sont les âges extrêmes et l'environnement associé aux soins, qui représentent des populations fréquemment exposées aux antibiotiques. Si l'on transpose la modélisation de l'évolution de la résistance décrite par Blanquart *et al.* à *E. coli* ST131, on se retrouverait dans un contexte de transmission hétérogène où les hôtes d'âges extrêmes et/ou les environnements associés aux soins constitueraient les foyers de haute transmission.

Il est communément établi que l'acquisition de résistance aux antibiotiques entraîne concomitamment une diminution du fitness bactérien, bien que des gains de fitness *in vivo* aient déjà été observés suite à l'acquisition de résistance aux antibiotiques, par exemple chez *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et *Vibrio cholerae*<sup>269</sup>. Il est également décrit que l'acquisition de résistance aux fluoroquinolones et aux C3G représente un coût initial chez *E. coli*, entraînant une diminution de son fitness : mutation des gyrases et diminution de fonctionnalité, poids du maintien d'un plasmide dans la cellule, etc.<sup>270</sup>. Mais l'évolution compensatoire peut permettre de pallier ce coût, la bactérie établissant alors un compromis entre fitness et résistance<sup>270</sup>. Ainsi, chez *E. coli*, la perte de fitness causée par des mutations au sein des gènes *gyrA* et *marR* peut être contrebalancée par des mutations compensatoires dans le gène *parC*<sup>271</sup>. Il a également été démontré que la substitution S83L qui résulte de la première étape de mutations du gène *gyrA* et qui est présente chez toutes les souches *E. coli* ST131 de clade C, confère la meilleure augmentation de concentration minimale inhibitrice (CMI) des fluoroquinolones, associée à un moindre coût en fitness<sup>272</sup>. Par la suite, l'émergence du sous-clade C2 au sein des ST131 pourrait avoir été initiée par l'acquisition d'un plasmide FII spécifique, suivie d'une coévolution entre hôte et plasmide améliorant le coût du maintien de ce plasmide et favorisant sa rétention<sup>80,101,102</sup>. Un récent travail prédit que ces mutations compensatrices se situeraient pour le clade C dans des régions régulatrices de gènes<sup>260</sup>. De plus, la forte pression de sélection exercée dans les années 1990-2000 par une importante utilisation clinique des fluoroquinolones et des C3G aurait permis la persistance de mutations chromosomiques induisant la résistance aux fluoroquinolones et favorisé la présence de gène *bla*<sub>CTX-M</sub>, faisant ainsi le lit de l'émergence du sous-clade C2 multirésistant aux antibiotiques. La prévalence croissante du cluster C1-M27 (souches du sous-clade C1 produisant CTX-M-27) au Japon et en

<sup>269</sup> D. Roux *et al.*, *Science Translational Medicine*, **7**: 297ra114–297ra114, 2015.

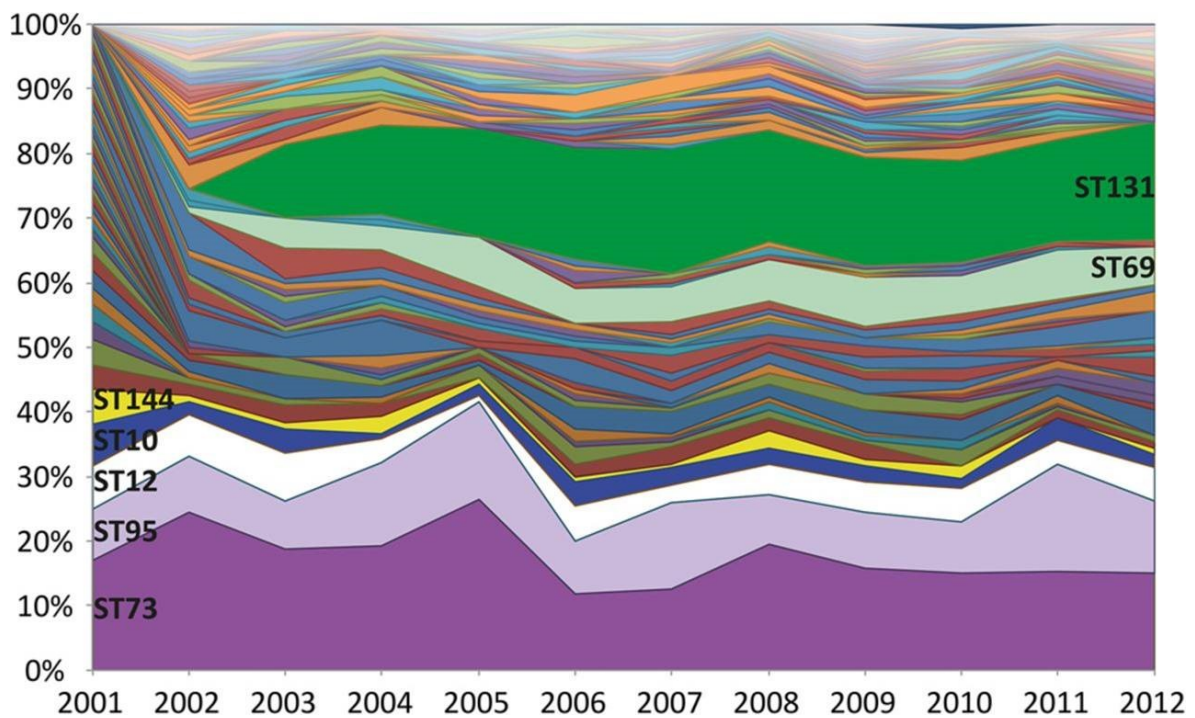
<sup>270</sup> P. Basra *et al.*, *Genome Biology and Evolution*, **10**: 667–679, 2018.

<sup>271</sup> L. L. Marcussen *et al.*, *PLoS pathogens*, **5**: e1000541, 2009.

<sup>272</sup> D. L. Huseby *et al.*, *Molecular Biology and Evolution*, **34**: 1029–1039, 2017.

Europe pourrait s'inscrire dans un processus similaire compte tenu que le portage et le maintien à moindre coût du plasmide porteur du gène *bla*<sub>CTX-M</sub> ont également été démontrés pour ce cluster<sup>101</sup>.

À l'inverse, une enquête récente faite sur une période de 11 ans et analysant les souches de *E. coli* responsables de bactériémies argumente sur le fait que la résistance aux antibiotiques n'aurait pas été un facteur majeur du succès de ST131<sup>133</sup>. Cette enquête montre que la population de ST131 s'est stabilisée autour de 20% après son apparition en 2003 au Royaume-Uni, dépassant de loin la prévalence des clones multirésistants déjà existants, comme ST88 et ST405, mais n'augmentant pas, *in fine*, la prévalence totale des phénotypes résistants aux antibiotiques dans la population de *E. coli* (Figure 9). De plus, les clones ExPECs majeurs préexistants comme ST73, ST95 et ST69, se sont maintenus à une fréquence équivalente à celle précédant l'émergence de ST131, et ce malgré leur résistance limitée aux antibiotiques. Les trois ST dominants (ST131, ST95 et ST73) ont en revanche en commun une grande diversité allélique des facteurs de colonisation et de facteurs de virulence chez l'Homme, impliqués dans la chélation du fer, la synthèse de fimbriae, et la division cellulaire<sup>260</sup>. Capacité de colonisation et virulence sembleraient donc aussi importantes que la résistance aux antibiotiques pour ériger la dominance d'un clone d'ExPEC en pathologie humaine.



**Figure 9.** Proportions de STs au cours des 11 ans d'échantillonnage systématique des *E. coli* isolés de bactériémies, d'après Kallonen *et al.*<sup>133</sup>. Le pourcentage de chaque ST est tracé par an et ordonné par ordre de fréquence au départ de l'étude. L'émergence de ST131 a été observée entre 2002 et 2003.

### C. Fitness et virulence

D'après M. Diard et W.D. Hardt<sup>263</sup>, la virulence se définit comme la capacité relative d'un micro-organisme à causer des dommages à un hôte et le fitness se définit comme la capacité d'un micro-organisme à se propager dans une population hôte. Le fitness ( $R$ ) est une fonction dépendante de la transmission ( $\beta$ ), de la mortalité initiale de l'hôte ( $\mu$ ) et de plusieurs paramètres décrivant la virulence et ses effets sur la densité de la population hôte, *i. e.* la mortalité induite par le pathogène ( $\alpha$ ) et la chance que l'hôte a de guérir de l'infection ( $\gamma$ ).

$$R = \frac{\beta}{\mu + \alpha + \gamma}$$

La modulation génétique est un autre concept pour expliquer la virulence bactérienne, selon lequel la virulence peut être abordée par le versant moléculaire, c'est-à-dire l'observation des interactions mécanistiques hôte-pathogène qui impliquent l'expression de VFs par le pathogène. Un VF se définit comme un attribut génétique qui « augmente les chances de causer des dommages à un hôte »<sup>263</sup>. Pour attester du caractère virulent d'un facteur, des preuves phénotypiques de lésions chez l'hôte ou d'autres effets sur l'interaction hôte-pathogène sont recherchées, survenant au cours d'expériences allant de la culture tissulaire au modèle animal d'infection. Dans l'émergence de la virulence extra-intestinale de *E. coli*, de nombreuses études d'inactivation de gènes<sup>273,274</sup> et d'associations de caractères accessoires<sup>275</sup> ont démontré le rôle de VFs. Ces gènes généralement colocalisés sur des îlots génomiques<sup>276</sup> ou îlots de pathogénicité codent le plus souvent des protectines, des adhésines, des toxines et des sidérophores<sup>277</sup>. Ainsi, le génome conservé de *E. coli* est adapté à la colonisation de l'intestin des mammifères mais l'invasion de niches écologiques alternatives au sein de la lumière intestinale, du tissu intestinal et d'autres organes extra-digestifs de l'hôte pourrait être rendue possible par l'acquisition de caractères additionnels, en particulier par transfert horizontal de gènes de virulence. L'évolution passe souvent par la capacité de *E. coli* à survivre au système immunitaire de l'hôte (capsule, adhésines) et à optimiser ses fonctions métaboliques (sidérophores), troquant ainsi son statut de commensale en statut de potentiel pathogène. L'acquisition d'îlots de pathogénicité *via* des éléments génétiques mobiles pourrait donc

<sup>273</sup> J. Tourret *et al.*, International journal of medical microbiology, **300**: 435–439, 2010.

<sup>274</sup> A. L. Lloyd *et al.*, Journal of Bacteriology, **191**: 3469–3481, 2009.

<sup>275</sup> J. R. Johnson *et al.*, The Journal of Infectious Diseases, **194**: 1141–1150, 2006.

<sup>276</sup> J. Hacker *et al.*, Annual Review of Microbiology, **54**: 641–679, 2000.

<sup>277</sup> M. A. Croxen *et al.*, Nature Reviews. Microbiology, **8**: 26–38, 2010.

augmenter le fitness de certaines souches de *E. coli* au sein de l'intestin de l'hôte et incidemment améliorer leur virulence dans les niches extra-intestinales<sup>30</sup>.

Une des hypothèses du succès de ST131 serait une virulence accrue de ce clone par rapport aux autres *E. coli*, lui conférant un avantage au sein d'une niche écologique. Les souches de *E. coli* ST131 détiennent en effet un ensemble unique d'éléments génétiques mobiles qui ont joué un rôle primordial dans leur évolution<sup>78</sup>, avant même l'acquisition de gènes codant la résistance aux fluoroquinolones<sup>22,78</sup>. Ce clone associe donc gènes de virulence et gènes de résistance, ce qui est peu fréquemment décrit parmi les *E. coli* B2<sup>161</sup>. Des études épidémiologiques moléculaires montrent qu'à résistance égale aux antibiotiques, *E. coli* ST131 possède un plus grand nombre de gènes de VFs que d'autres *E. coli*<sup>99,207,278-280</sup>. Par une analyse comparative de génomes d'ExPEC, deux études ont montré que le gène de virulence *espC* (autotransporteur de protéase à sérine) était fortement associé au ST131<sup>133,280</sup>. Les gènes de VFs suivants sont également fréquemment décrits chez *E. coli* ST131 : *sat* (toxine), *fimH* (adhésine du fimbriae de type 1), *fyuA* (récepteur de la yersiniabactine), *kpsM II* (groupe capsulaire II), *usp* (protéine uropathogène spécifique), *malX* (marqueur d'ilôt de pathogénicité), *iha* (adhésine), *ompT* (récepteur membranaire), *iucD* (aérobactine), *iutA* (récepteur de l'aérobactine) et *traT* (associé à la résistance au sérum)<sup>22</sup>. Certains gènes de virulences sont plus rarement décrits chez ST131, comme l'opéron *afa/draBC* (adhésines), *hlyA* (hémolysine alpha), *iss* (résistance au sérum) et *iroN* (récepteur de sidérophores) et d'autres sont quasiment absents chez ST131, bien que fréquemment décrits chez les *E. coli* B2 : *papG* (adhésine du fimbriae P) et *cnf1* (facteur nécrotoxique)<sup>22,281</sup>. Toutefois, une variabilité fine des profils de virulence au sein des ST131 a pu mettre en évidence que les gènes *iha*, *sat*, *iutA*, *malX*, *kpsM II-K2* sont prévalents chez les isolats de clade C et les gènes *iroN*, *neuC-K1* (capsule), *iss* et *ibeA* (invasine) sont prévalents chez les isolats d'autres clades de ST131 (« non-H30 »)<sup>282-284</sup>. Au regard de cette variabilité, Blanco *et al.* ont élaboré une classification en groupe de virulence, ou virotypes, initialement dénommés de A à D selon la présence ou l'absence des gènes *afa*, *iroN*, *ibeA* et *sat*<sup>233</sup>. Par la suite, les virotypes C et D ont été subdivisés et les virotypes E et F ont été ajoutés<sup>208,285</sup> (Tableau 1). Des différents dominant en fonction du clade ou sous-clade de ST131 : le virotipe D domine au sein du clade B, le

<sup>278</sup> J. R. Johnson *et al.*, *Clinical Infectious Diseases*, **51**: 286–294, 2010.

<sup>279</sup> M. K. Cha *et al.*, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **84**: 102–104, 2016.

<sup>280</sup> S. Shaik *et al.*, *mBio*, **8**: e01596–17, 2017.

<sup>281</sup> M.-H. Nicolas-Chanoine *et al.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **61**: 273–281, 2007.

<sup>282</sup> R. Banerjee *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**: 6385–6388, 2013.

<sup>283</sup> I. Merino *et al.*, *PloS One*, **12**: e0188838, 2017.

<sup>284</sup> B. Olesen *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58**: 6886–6895, 2014.

<sup>285</sup> A. Mora *et al.*, *PLoS ONE*, **9**: e87025, 2014.

virotype C domine au sein du sous-clade C1, et le virotype A au sein du sous-clade C2, suivi par les virotypes B, E et F<sup>208,284</sup>. Par ailleurs, un score de virulence plus élevé a été observé chez les isolats appartenant au virotype D<sup>233</sup>. Le virotype B a été significativement associé aux patients âgés, à une plus grande probabilité d'infection urinaire asymptomatique et d'infection respiratoire. Le virotype C a été au contraire associé à une plus grande probabilité d'infection symptomatique. Le virotype D a été associé aux patients jeunes et aux infections communautaires, alors que les virotypes A et B l'ont été aux patients d'EPHAD<sup>233</sup>. Dans l'ensemble, la moyenne du score de virulence des clades de ST131 diffère selon les études : dans une, elle est plus élevée pour le sous-clade C2 (12 VFs), suivi des clades non-C (11 VFs) puis du sous-clade C1 (10 VFs) (différence significative pour la comparaison des trois groupes)<sup>283</sup> et dans une autre, cette moyenne de score de virulence est équivalente entre les sous-clades<sup>282</sup>.

**Tableau 1. Les différents virotypes de *E. coli* ST131 et les gènes les définissant, d'après Dahbi *et al.*<sup>208</sup>.**

Virotype	<i>afa/</i> <i>draBC</i>	<i>afa</i> operon FM955459	<i>iroN</i>	<i>sat</i>	<i>ibeA</i>	<i>papG</i> II	<i>papG</i> III	<i>cnf1</i>	<i>hlyA</i>	<i>cdtB</i>	<i>neuC-</i> K1	<i>kpsM</i> II-K2	<i>kpsM</i> II-K5
A	+	+	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
B	-	-	+	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	+/-
C1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
C2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
C3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D1	-	-	+/-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
D2	-	-	+/-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
D3	+/-	+/-	+/-	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
D4	-	-	+/-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
D5	-	-	+/-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+
E	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+
F	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+

Ainsi, tant les données moléculaires que les données cliniques suggèrent que les *E. coli* ST131 sont plus virulents que les autres *E. coli*. Toutefois, les données d'expérimentations *in vivo* sont contradictoires concernant la virulence de ST131. Une virulence élevée des isolats de ST131 a été mise en évidence chez la souris dans un modèle de péritonite avec 100% des souris tuées par l'infection<sup>58</sup>. De même, la virulence accrue de *E. coli* ST131 vis-à-vis d'autres ExPEC a été montrée dans différents modèles animaux : au stade larvaire du papillon *Galleria mellonella*<sup>286</sup> et chez le poisson-zèbre *Danio rerio*<sup>186</sup>. Pantel *et al.* et Lavigne *et al.* ont montré que les souches ST131 testées (S250 du clade B et MCEBC de clade C2) étaient moins virulentes que la souche CFT03 (UPEC, groupe B2, non-ST131) et

<sup>286</sup> H. Ciesielczuk *et al.*, Virulence, 6: 145–151, 2015.

aussi virulentes que la souche ED1a (commensale, groupe B2) dans le modèle nématode *Caenorhabditis elegans*<sup>287,288</sup>. Ces auteurs ont obtenu des résultats similaires dans le modèle poisson-zèbre, associé au fait que la souche S250 était, dans ce modèle, plus virulente que la souche du sous-clade C2<sup>288</sup>. Une autre étude a par ailleurs montré que l'appartenance au clone ST131 n'était pas corrélée à la sévérité de l'infection dans un modèle de septicémie chez la souris<sup>289</sup>. Au sein même des *E. coli* ST131, le niveau de virulence semble varier en fonction des virotypes, les virotypes A, B et C (associés au clade C) entraînant d'avantage de morts que les virotypes D (associé au clade B) et E, dans un modèle de septicémie par injection sous-cutanée chez la souris<sup>285</sup>. Ces résultats divergents pourraient s'expliquer par l'utilisation de différents modèles animaux, de conditions expérimentales diverses et de souches différentes.

En résumé, l'expansion massive de ST131 dans le monde entier semble être précédée par un remaniement génétique incluant des recombinaisons et l'acquisition d'ilôts de pathogénicité, suivie de l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques. Un potentiel de virulence plus élevé n'apparaît pas comme étant l'atout principal expliquant ce succès épidémiologique. Ce succès pourrait être le reflet d'aptitudes se situant en amont de la pathogénèse et entrant en jeu lors de la transmission ou de la colonisation, c'est-à-dire au cours de la sélection et de la multiplication au sein des réservoirs de *E. coli*, en particulier le tractus intestinal.

---

<sup>287</sup> A. Pantel *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **60**: 2901–2911, 2016.

<sup>288</sup> J.-P. Lavigne *et al.*, *PloS One*, **7**: e34294, 2012.

<sup>289</sup> J. R. Johnson *et al.*, *Infection and Immunity*, **80**: 1554–1562, 2012.

### III.2. Capacité de colonisation de ST131

Nowrouzian *et al.* ont pu mettre en évidence que les VFs portés par les *E. coli* du groupe phylogénétique B2 contribuent à leur forte capacité de colonisation, et peuvent donc être considérés comme des facteurs améliorant le fitness dans l'intestin humain, principal réservoir des ExPEC<sup>290</sup>. Une meilleure capacité de colonisation augmente les chances d'une bactérie d'être transmise à un nouvel hôte et pourrait ainsi avoir joué un rôle dans le succès du clone ST131.

#### A. Production de biofilm et ST131

Au sein des communautés intestinales, la plupart des bactéries ne sont pas librement dispersées, mais évoluent en micro-colonies, ou biofilm de micro-organismes sessiles attachés au mucus ou se développant au sein même de la couche de mucus<sup>291,292</sup>. La persistance de *E. coli* dans l'intestin a directement été reliée à la capacité d'adhésion, qui joue un rôle crucial dans la formation de biofilm chez *E. coli*<sup>293</sup>. Dans le tractus urinaire, les cellules des ExPECs sont aussi présentes sous des conformations semblables à du biofilm, ce qui assure leur persistance<sup>294</sup>.

Le terme de « biofilms » illustre des communautés bactériennes multicellulaires complexes et sessiles, adhérant entre elles et sur une surface, enveloppées dans une matrice extracellulaire composée de protéines comme les curlis et les fimbriae, de polysaccharides comme le cellulose, l'acide colanique ou le poly-N-acétylglucosamine<sup>295</sup>. C'est un environnement hétérogène, dynamique et structuré, d'architecture complexe. Son développement se déroule en cinq étapes<sup>296</sup> (Figure 10):

- adhésion des bactéries de la phase planctonique à une surface de manière réversible, *via* des forces d'attractions physico-chimiques,
- multiplication bactérienne et synthèse de structures à la surface des bactéries rendant l'adhésion irréversible, formation d'amas bactérien et synthèse de polysaccharides extracellulaires,
- formation de micro-colonies,
- développement en biofilm mature par structuration du biofilm : micro-colonies englobées dans

<sup>290</sup> F. L. Nowrouzian *et al.*, *Microbes and Infection*, **8**: 834–840, 2006.

<sup>291</sup> S. Ahmed *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 7435–7442, 2007.

<sup>292</sup> G. T. M. S. Macfarlane M. J. Hopkins., *Microbial Ecology in Health and Disease*, **12**: 64–72, 2000.

<sup>293</sup> F. Nowrouzian *et al.*, *Pediatric Research*, **54**: 8, 2003.

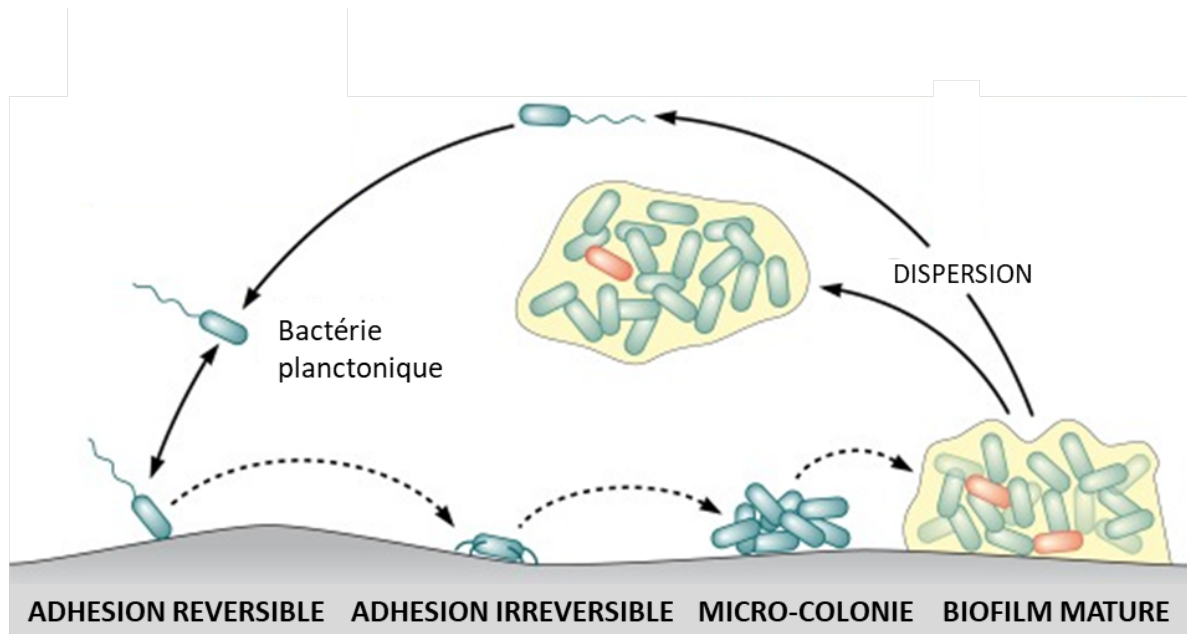
<sup>294</sup> G. G. Anderson *et al.*, *Science*, **301**: 105–107, 2003.

<sup>295</sup> S. Subashchandrabose *et al.*, *Microbiology Spectrum*, **3**: , 2015.

<sup>296</sup> A. Roux *et al.*, *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 261, 2006.



- la matrice extracellulaire et séparées par des canaux où circulent des fluides nutritifs,
- enfin, dispersion et libération de bactéries planctoniques permettant la colonisation de nouvelles surfaces.



**Figure 10.** Les différentes étapes de formation d'un biofilm de *E. coli*, adaptée de Lebeaux *et al.*<sup>297</sup>.

De très nombreux facteurs entrent donc en jeu dans la formation de biofilm chez *E. coli* qui a été étudiée de manière approfondie chez *E. coli* K-12<sup>298</sup>. La diversité de ces facteurs a été illustrée au cours d'une étude de la « collection Keio », centrée sur la capacité à former du biofilm qu'ont les mutants K-12 chacun délété d'un unique gène. Ainsi, 110 gènes dont la délétion induit à elle seule une réduction de la formation de biofilm ont été identifiés<sup>299</sup>.

L'adhésion est une étape cruciale dans la formation de biofilm dont les principaux acteurs sont les adhésines. Les adhésines sont des appendices protéiques de surface de longueur variable (de quelques nanomètres à plusieurs micromètres) qui reconnaissent des composants abiotiques ou des substrats spécifiques comme les oligosaccharides<sup>300</sup>. Chez *E. coli*, deux types d'adhésines existent : i) les adhésines fimbriales, ou pili, des hétéropolymères comprenant les « chaperone-usher » pili, les curli et le pilus de type IV<sup>301</sup>, et ii) les adhésines non-fimbriales comme les auto-transporteurs<sup>302</sup>.

<sup>298</sup> C. Beloin *et al.*, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 249–289, 2008.

<sup>299</sup> E. T. E. Niba *et al.*, *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, **14**: 237–246, 2007.

<sup>300</sup> C. Sakamoto., PhD thesis, Paris 7, 2013.

<sup>301</sup> R. Fronzes *et al.*, *The EMBO Journal*, **27**: 2271–2280, 2008.

<sup>302</sup> R. G. Gerlach *et al.*, *International journal of medical microbiology*, **297**: 401–415, 2007.

Dans ce travail, nous nous intéresserons uniquement aux adhésines fimbriales.

Les curli sont de fins fimbriae agrégatifs décrits chez *E. coli*, *Salmonella* spp et *Citrobacter* spp, impliqués dans l'interaction cellule à cellule et dans l'adhésion à des surfaces inertes et biologiques, par interaction avec la fibronectine, la laminine ou encore des molécules du système d'histocompatibilité de type I<sup>303,304</sup>. Les gènes permettant la production de curli sont regroupés en deux opérons : *csgBA*, qui code les composants de structure des curli, et *csgDEFG*, encodant les gènes nécessaires à l'export des sous-unités du curli, à la stabilisation des fibres, et à la régularisation de l'expression de *csgBA*<sup>303</sup>.

Les fimbriae de type 1 sont exprimés par plus de 90% des *E. coli* et font partie de la famille des « chaperone-usher » fimbriae, dont la biogénèse implique une sous-unité structurale majeure, une protéine chaperone périplasmique ainsi qu'une plateforme d'assemblage extra-membranaire, ou « usher »<sup>300</sup>. Les gènes codant les protéines structurales et d'assemblage de ce système sont regroupés dans l'opéron *fimAICDFGH*, en aval des gènes de régulation *fimB* et *fimE*, codant des recombinases. Ce type de fimbriae sont de longues tiges hélicoïdales formées d'une hélice de 500 à 3000 copies de la sous-unité structurale majeure FimA, et connectées par FimF et FimG à la sous-unité FimH située à l'extrémité du fimbriae (Figure 11). Cette adhésine terminale FimH de 30 KDa est une lectine présentant une affinité pour les oligosaccharides exposant un résidu mannose terminal, typiquement présents sur les récepteurs de l'épithélium vésical, mais également au niveau pulmonaire, intestinal, buccal, sur les cellules tubulaires proximales rénales et les cellules inflammatoires<sup>305,306</sup>. Le degré d'adhésion de la bactérie est en partie déterminé par la structure de la sous-unité FimH, qui résulte en des variants ayant des niveaux différents de capacité d'adhésion<sup>307</sup>. Ainsi, toutes les sous-unités de FimH décrites entraînent une adhésion de haut niveau aux résidus trimannoses (M3), mais seulement certains variants permettent une adhésion de haut niveau aux résidus monomannoses (M1), faculté importante pour l'adhésion aux cellules épithéliales urinaires<sup>308</sup>. Il existe deux catégories de fimbriae de type 1 : ceux qui se lient faiblement aux résidus M1 (M1-Low ou M1L) et ceux qui se lient fortement aux résidus M1 (M1-High ou M1H), cette différence semblant influencer sur la niche d'appartenance des souches de *E. coli*<sup>309</sup>. En effet,

<sup>303</sup> E. Brombacher *et al.*, *Microbiology*, **149**: 2847–2857, 2003.

<sup>304</sup> J. Grégory., PhD thesis, INSA Lyon, 2005.

<sup>305</sup> W. R. Schwan *et al.*, *Journal of Pathogens*, **2018**: 2897581, 2018.

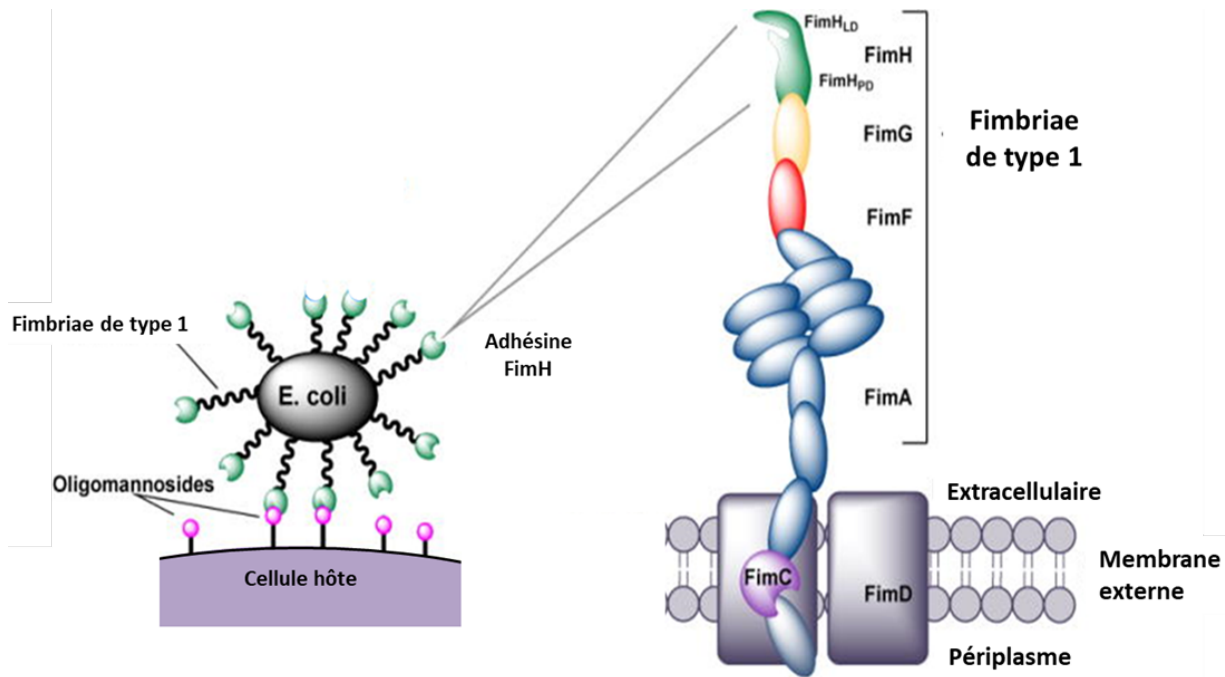
<sup>306</sup> W. R. Schwan *et al.*, *Journal of Pathogens*, **2017**: 8694356, 2017.

<sup>307</sup> E. V. Sokurenko *et al.*, *Journal of Bacteriology*, **177**: 3680–3686, 1995.

<sup>308</sup> E. V. Sokurenko *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, **272**: 17880–17886, 1997.

<sup>309</sup> E. V. Sokurenko *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**: 8922–8926, 1998.

la majorité des isolats du tractus intestinal expriment un phénotype M1L alors que la plupart des isolats provenant d'infections urinaires expriment le phénotype M1H<sup>309</sup>. Les variations de FimH pourraient donc changer le tropisme tissulaire de *E. coli* et en faire un facteur majeur de l'adaptation bactérienne à une nouvelle niche écologique.



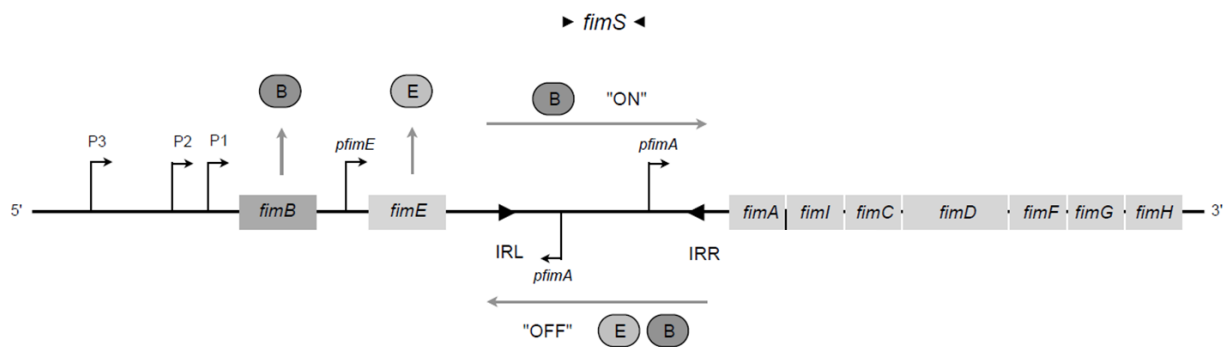
**Figure 11. Représentation schématique du fimbriae de type 1 de *E. coli*, d'après Mydock-McGrane LK *et al.*<sup>310</sup>.**

L'adhésion est la première étape de la colonisation d'une surface *via* la production de biofilm, qui peut être suivie d'invasion cellulaire et de persistance bactérienne dans les cellules hôtes<sup>311,312</sup>. Lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables, le biofilm peut se dissocier et libérer des bactéries planctoniques de sorte à coloniser de nouvelles niches : de multiples voies de régulation permettent d'orchestrer ces changements, en particulier en modulant la production et l'exposition des adhésines. En effet, l'expression de FimA est affectée par un processus de changements ON-OFF permettant aux cellules d'alterner entre un stade d'expression de fimbriae de type 1 à sa surface (phase ON) et un stade de non-expression (phase OFF). Ce changement de phase est dû à l'inversion d'un élément de régulation contenant le promoteur du gène *fimA*, promoteur essentiel à la transcription des gènes de structure du fimbria (Figure 12). Cet élément inversible, *fimS*, est constitué de 296 bp flanquées de deux séquences inversées-répétées (IRR et IRL)<sup>300,306</sup>. Cette inversion est orchestrée par les recombinases FimB et FimE, qui agissent indépendamment

<sup>311</sup> J. J. Martinez *et al.*, The EMBO Journal, **19**: 2803–2812, 2000.

<sup>312</sup> M. A. Mulvey *et al.*, Infection and Immunity, **69**: 4572–4579, 2001.

en se liant à des régions spécifiques proches de *fimS*. FimB peut entraîner l'inversion de *fimS* dans les deux orientations (ON→OFF et OFF→ON) avec un léger biais vers l'orientation de OFF à ON alors que FimE a un degré élevé de spécificité pour la variation de phase entraînant la conformation de ON à OFF<sup>306</sup>. Ces recombinases sont transcrites de manière indépendante, *via* deux promoteurs pour le gène *fimB* (l'existence d'un 3<sup>ème</sup> promoteur identifié chez les UPEC demandant à être confirmée) et *via* un seul promoteur pour le gène *fimE*, cette transcription étant elle-même soumise à de nombreux régulateurs influençant directement le taux d'inversion de *fimS*<sup>300</sup>.



**Figure 12. Schéma du mécanisme de la variation de phase de l'opéron *fim*, d'après C. Sakamoto<sup>300</sup>.** Les séquences inversées répétées (IRL et IRR) sont indiquées par des triangles noirs ; les promoteurs sont représentés par des flèches noires pleines.

Parmi les *E. coli* pathogènes, le rôle de la production de biofilm dans la pathogénèse a été bien défini chez les InPEC et en particulier les EAEC. Responsables de diarrhées chez l'enfant qui peuvent être persistantes, les EAEC ont été démontrés dans plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo* comme adhérents à la muqueuse de l'intestin grêle et du gros intestin<sup>313-315</sup>, et décrits comme ayant la plus grande capacité de formation de biofilm parmi une collection de *E. coli* de différents pathovars<sup>316</sup>. Les AIEC, impliqués dans la pathogénèse de maladies inflammatoires de l'intestin, en particulier la maladie de Crohn, constituent aussi un pathovar connu pour produire davantage de biofilm que d'autres souches de *E. coli* du mucus intestinal<sup>317</sup>. L'étude de la production de biofilm chez les ExPEC a essentiellement concerné les souches uropathogènes : la majorité des UPEC sont capables de former du biofilm, les isolats responsables de pyélonéphrites d'avantage que ceux responsables d'infections urinaires basses, mais sans différence évidente entre souches isolées

<sup>313</sup> J. P. Nataro *et al.*, *Infection and Immunity*, **64**: 4761–4768, 1996.

<sup>314</sup> S. Tzipori *et al.*, *Infection and Immunity*, **60**: 5302–5306, 1992.

<sup>315</sup> P. A. Vial *et al.*, *The Journal of Infectious Diseases*, **158**: 70–79, 1988.

<sup>316</sup> J. Schiebel *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, **83**: , 2017.

<sup>317</sup> M. Martinez-Medina *et al.*, *BMC microbiology*, **9**: 202, 2009.

d'infections urinaires sur sonde et celles isolées d'infection urinaire sans matériel étranger<sup>318-320</sup>. *in vivo*, la production de biofilm se traduirait en partie par une conformation intracellulaire en « gosses » de bactérie au sein l'épithélium vésical<sup>294</sup>.

La formation de biofilm a également été explorée au sein des *E. coli* ST131. Au niveau moléculaire, trois allèles majoritaires de *fimH* ont été décrits, chacun spécifique d'un clade : *fimH41* pour le clade A, *fimH22* pour le clade B et *fimH30* pour le clade C. Une plus forte adhésion aux résidus mannose de l'allèle *fimH30* comparé à *fimH41* a par ailleurs été décrite, l'allèle *fimH22* n'ayant pas été testé dans ces travaux<sup>321</sup>. De plus, *in silico*, les souches de clade C (FimH30) présentent une affinité pour les résidus monomannoses, caractéristique associée aux UPEC, alors que les souches de clade B (FimH22) ne semblent pas présenter d'affinité augmentée pour ces résidus, caractéristique associée aux souches commensales<sup>150,309</sup>. L'opéron *fim* des isolats ST131 présente une particularité intéressante : une séquence d'insertion ISEc55 est intégrée dans le gène *fimB* de tous les ST131 de clade C, le rendant inactif<sup>78,79</sup>. Comme le gène *fimB* code une recombinase régulant la synthèse de l'opéron *fim*, il est probable que cette séquence d'insertion influence grandement l'expression du fimbriae de type 1.

Au niveau phénotypique, les études explorant la production de biofilm chez ST131 exposent des résultats contrastés. La capacité de production de biofilm par une souche de ST131 a été mise en évidence par Clermont *et al.* à partir de la souche UPEC TN03<sup>58</sup>, et une équipe américaine a mis en évidence une plus grande capacité de production de biofilm de souches ST131 comparées aux non-ST131, d'origine fécale et urinaire<sup>147</sup>. Plusieurs autres études ont montré une capacité équivalente ou moindre à former du biofilm de la part de souches ST131 comparativement à des souches non-ST131<sup>186,284,322,323</sup>. Concernant la moindre production de biofilm des souches ST131, sa mise en évidence été faite à l'aide de deux types de techniques, ce qui tend à renforcer la fiabilité de ces résultats. Une des techniques est la coloration au cristal violet qui consiste à quantifier le biofilm formé après 48 h de croissance par mesure de la densité optique, et l'autre technique est celle du BioFilm Ring Test<sup>®</sup> (BRT) qui permet de mesurer la formation de biofilm précoce, *i.e.* dans les premières heures de culture. Pour ce faire, le procédé consiste en l'ajout de microbilles magnétiques au milieu

<sup>318</sup> J. Agarwal *et al.*, Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, **107**: 183–187, 2013.

<sup>319</sup> R. E. Watts *et al.*, Journal of Clinical Microbiology, **48**: 2449–2458, 2010.

<sup>320</sup> T. Tapiainen *et al.*, European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, **33**: 111–115, 2014.

<sup>321</sup> S. Paul *et al.*, Journal of Bacteriology, **195**: 231–242, 2013.

<sup>322</sup> A. Novais *et al.*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **56**: 3973–3976, 2012.

<sup>323</sup> L. Surgers *et al.*, International journal of medical microbiology: IJMM, **309**: 13–18, 2019.

de culture distribué dans les puits d'une microplaque de 96 puits et en l'évaluation de l'aspect de chaque puits de la microplaque après son apposition sur un bloc spécifique composé de 96 micro-aimants placés sous chaque puits. Un aspect ponctiforme révélera la liberté de mouvement des billes et donc l'absence de formation de biofilm, et à l'inverse, un aspect diffus révélera l'immobilité des billes, et donc la formation de biofilm<sup>324</sup>. La technique du BRT est celle que nous avons choisie pour nos travaux personnels.

Quelques études récentes se sont plus particulièrement penchées sur la production du biofilm au sein des *E. coli* ST131 et ont mis en évidence l'hétérogénéité de leur phénotype de formation de biofilm<sup>325,326</sup>. Sarkar *et al.* montrent ainsi que la formation de biofilm chez ST131 est dépendante du milieu de culture, plus importante en milieu riche que dans l'urine et en milieu minimum, et plus importante lorsque le milieu est supplémenté en fer<sup>325</sup>. Cette équipe met également en évidence que le phénotype de formation de biofilm est corrélé à l'expression du fimbriae de type 1 chez ST131, ce qui pourrait expliquer l'hétérogénéité de capacité de formation de biofilm des ST131<sup>325</sup>. En effet, l'insertion de ISEc55 au sein du gène régulateur *fimB* entraîne une modification de l'expression du fimbriae de type 1 puisque les régulateurs qui prennent alors le relais, comme FimE et FimX, favorisent d'avantage le switch ON-OFF que OFF-ON de l'élément inversible *fimS* qui porte le promoteur de l'opéron *fim*<sup>326</sup>. Nicolas-Chanoine *et al.* ont également observé des différences phénotypiques dans la formation de biofilm selon l'allèle *fimH* de souches de ST131, avec une formation plus importante de biofilm précoce chez les souches *fimH22* (clade B), que chez les souches *fimH30* (clade C)<sup>150</sup>. Sachant que ISEc55 se trouve uniquement dans le gène *fimB* de souches ST131 appartenant au clade C, ces derniers résultats appuient l'hypothèse selon laquelle les différences d'expression du fimbriae de type 1 seraient en partie responsables de la diversité de phénotypes de formation de biofilm observée chez ST131.

## B. Colonisation du tractus intestinal par ST131

Un meilleur fitness peut résider pour une bactérie dans l'augmentation des chances d'être transmise à un nouvel hôte. La colonisation du tractus intestinal, en particulier de l'intestin des mammifères, réservoir principal de *E. coli*, est donc l'une des clefs du succès pour tout *E. coli*. En plus de permettre sa large dissémination, il semble que la colonisation intestinale soit un prérequis aux infections extra-intestinales, la flore intestinale constituant ainsi un réservoir de l'infection, en

<sup>324</sup> E. Olivares *et al.*, *Journal of Clinical Microbiology*, **54**: 657–661, 2016.

<sup>325</sup> S. Sarkar *et al.*, *Pathogens and Disease*, **74**: , 2016.

<sup>326</sup> S. Sarkar *et al.*, *Molecular Microbiology*, **101**: 1069–1087, 2016.

particulier dans l'hypothèse « fécale-périnéale-urétrale » des infections urinaires<sup>327</sup>.

*E. coli* ST131 est capable de coloniser le tractus intestinal humain pendant des mois, voire des années, et ce en l'absence de sélection antibiotiques<sup>125</sup>. Trois gènes de virulence présents chez l'ensemble des *E. coli* ST131 ont été décrits comme facilitant la colonisation intestinale au cours de la première année de vie chez l'Homme : *fyuA*, codant le récepteur de la yersiniabactine, *malX*, codant une phosphotransférase reconnaissant le glucose et le maltose, et *usp*, codant une bactériocine<sup>328</sup>. D'autre part, Mac Nally *et al.* ont récemment mis en évidence une diversité allélique des gènes du métabolisme anaérobie plus importante chez les *E. coli* ST131 de clade C que chez d'autres lignées dominantes d'ExPEC, comme ST95 ou ST73<sup>260</sup>. Cette diversité pourrait être le reflet d'une meilleure adaptation intestinale de ST131. De même, des souches ST131 de clade C2 ont présenté une meilleure capacité d'adhésion et d'invasion des cellules Caco-2 (lignée de cellules épithéliale d'adénocarcinome colorectal humain) ainsi qu'une plus grande mobilité que des *E. coli* non-ST131<sup>329,330</sup>, argumentant en faveur de capacités de colonisation supérieures de ST131. Des résultats contradictoires ont été néanmoins publiés montrant la faible capacité d'adhésion sur cellules Caco-2 de deux souches ST131 de clade C productrices de CTX-M-15 et de NDM-1, respectivement<sup>331</sup>. Le potentiel de colonisation de *E. coli* ST131 a pour la première fois été décrit dans un modèle murin de colonisation intestinale, après traitement par de la streptomycine<sup>332</sup>. En compétition dans ce modèle, la souche TN03, appartenant au clade C2, surpasse les souches K-12 et ED1A, souche de *E. coli* commensale du groupe phylogénétique B2. Une seule étude a comparé *in vitro* les différents clades de ST131 au regard de la colonisation et n'a montré aucune différence entre les souches de clade B et C dans les capacités d'adhésion à des cellules intestinales et d'invasion de ces cellules<sup>330</sup>.

Le fimbriae de type 1 joue un rôle primordial dans la colonisation intestinale. Il augmente la persistance de *E. coli* dans l'intestin par formation de communautés assimilées à du biofilm<sup>333</sup>, et facilite également l'attachement au tissu intestinal comme démontré pour les ETEC<sup>334</sup>. La suppression du gène *fimH* ( $\Delta fimH$ ) d'une souche de *E. coli* uropathogène entraîne sa moindre persistance dans le tube digestif de la souris, comparativement à celle de la souche parentale<sup>333</sup>.

<sup>327</sup> Yamamoto Shingo *et al.*, *Journal of Urology*, **157**: 1127–1129, 1997.

<sup>328</sup> A. Ostblom *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, **77**: 2303–2308, 2011.

<sup>329</sup> K. Kondratyeva *et al.*, *Journal of Medical Microbiology*, **66**: 1350–1357, 2017.

<sup>330</sup> S. Sarkar *et al.*, *The Journal of Infectious Diseases*, **218**: 979–990, 2018.

<sup>331</sup> G. Peirano *et al.*, *Journal of Medical Microbiology*, **62**: 525–530, 2013.

<sup>332</sup> S. Vimont *et al.*, *PloS One*, **7**: e46547, 2012.

<sup>333</sup> C. W. Russell *et al.*, *Infection and Immunity*, **86**: , 2018.

<sup>334</sup> A. Sheikh *et al.*, *PLoS neglected tropical diseases*, **11**: e0005586, 2017.

Néanmoins, il a été noté que cette diminution de fitness intestinal pouvait également être liée à la surexpression du gène *fliC* qui suit l'inactivation du fimbriae de type 1. Cette surexpression entraîne une augmentation de la mobilité bactérienne et stimule potentiellement la réponse inflammatoire de l'hôte. Des expériences faites avec un variant  $\Delta fimH$  de ST131 ont également démontré que l'expression du fimbriae de type 1 favorisait l'adhésion aux cellules intestinale et l'invasion de ces cellules<sup>330</sup>. Dans cette même étude, l'expression du fimbriae de type 1 n'influçait pas la capacité de colonisation intestinale après 11 jours chez des souris prétraitées à la streptomycine, mais entraînait un niveau de colonisation plus important dans un modèle utilisant des souris non traitées par antibiotiques. Ce dernier résultat montre d'une part que *E. coli* ST131 n'a pas besoin de prétraitement antibiotique pour s'implanter dans l'intestin de souris, et souligne d'autre part le rôle de la flore résidente dans la persistance des souches de *E. coli* dans l'intestin.

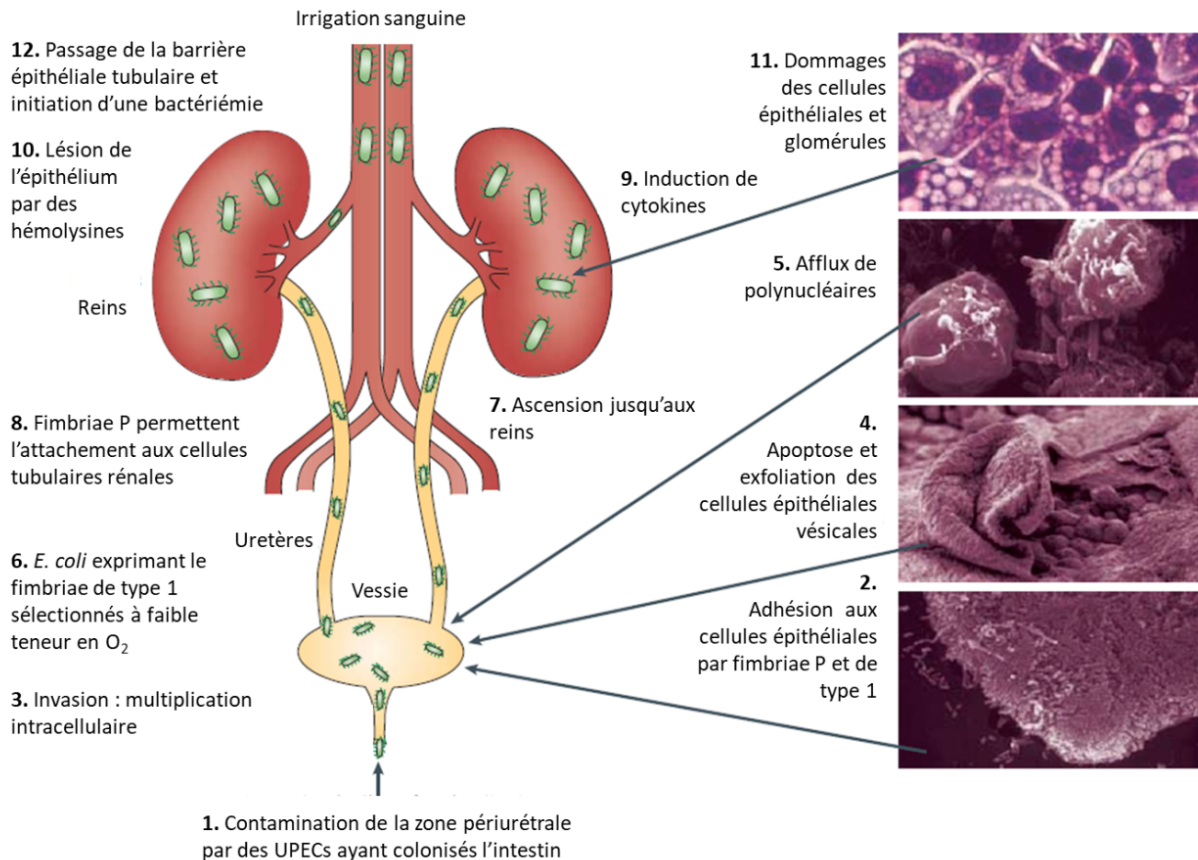
### C. Colonisation de l'arbre urinaire par ST131

La colonisation de l'arbre urinaire peut être, pour une bactérie, un moyen alternatif d'augmenter les chances d'être transmise à un nouvel hôte, en particulier dans le cas des bactériuries asymptomatiques.

Toute infection urinaire ascendante commence par la contamination de la région périnéale par une bactérie pathogène provenant du tube digestif, un UPEC par exemple, suivie par une colonisation de l'urètre (Figure 13). Les bactéries migrent ensuite jusqu'à la vessie, et en 4 à 24 h dans cet environnement urinaire, sont sélectionnés les UPECs qui colonisent et envahissent les cellules épithéliales grâce à l'expression de pili et d'adhésines<sup>31,35</sup>. La réponse inflammatoire de l'hôte détruit alors les bactéries extracellulaires *via* l'infiltration des polynucléaires neutrophiles. Mais certaines bactéries sont capables d'échapper à cette réponse immunitaire, soit en envahissant les cellules de l'hôte, soit en adoptant des changements morphologiques empêchant leur reconnaissance (antigène capsulaire), ce qui permet leur multiplication<sup>35</sup>. D'une part, la production de fimbriae de type 1, de curli et d'antigène 43 permet la formation de biofilm (attachement des bactéries à la surface vésicale et création d'interactions inter-bactériennes)<sup>35</sup>, et d'autre part, les UPECs s'organisent en communautés intracellulaires qui peuvent être assimilées à du biofilm, formant des renflements en forme de gousses à la surface de la vessie<sup>294</sup>. Ces gousses qui sont composées de bactéries entourées d'une matrice polysaccharidique enrobée d'une enveloppe protectrice d'urolakine permettent la protection des bactéries contre les antibiotiques, les défenses de l'hôte et autres stress<sup>294</sup>. L'attachement



des bactéries induit également une apoptose cellulaire et une exfoliation de cellules épithéliales, et la production bactérienne de toxines (HlyA, CNF1) entraîne des dommages cellulaires, libérant des nutriments indispensables à leur multiplication<sup>31,35</sup>. Ceci ouvre ensuite la voie à l'ascension des uretères jusqu'aux reins puis à la colonisation rénale grâce à la synthèse de fimbriae de type P<sup>335</sup>, et à la production de toxines. L'infection peut progresser jusqu'à entraîner une bactériémie, par passage de la barrière tubulaire par les bactéries<sup>31</sup>.



**Figure 13. Pathogénèse d'une infection urinaire causée par un *E. coli* uropathogène (UPEC), d'après Kaper *et al.*<sup>31</sup>.**

L'adhésion est donc la clef qui initie chaque étape de l'infection urinaire, en particulier celle menée par les fimbriae de type 1, qui se lient aux résidus mannoses des récepteurs de l'urolakine recouvrant les cellules épithéliales de la vessie. Il a été montré que l'attachement aux résidus mannoses provoquait des changements physiologiques chez la bactérie, entraînant une surexpression du gène *fimB* et une répression du gène *fimE*<sup>305</sup>. Ces modifications aboutissent alors à d'avantage d'éléments inversibles *fimS* en position ON, et donc à un maintien de l'expression du fimbriae de type 1, même au sein de l'environnement acide urinaire. À l'inverse, il a été démontré que l'ascension des bactéries jusqu'aux reins s'accompagne d'une augmentation de la proportion de *fimS* en phase

<sup>335</sup> T. K. Korhonen *et al.*, *Infection and Immunity*, **54**: 328–332, 1986.

OFF chez la souris, diminuant l'expression de fimbriae de type 1<sup>306</sup>. Il semblerait donc que la non-expression du fimbriae de type 1 soit un avantage pour survivre dans le rein. L'expression de ces fimbriae par *E. coli* ST131 a été explorée au cours d'infections urinaires chez la souris, au regard de la particularité des souches du clade C, pour lesquelles le gène *fimB* est inactivé par l'insertion de ISEc55. Dans un modèle d'infection urinaire ascendante chez la souris, Vimont *et al.* ont observé une concentration plus importante de la souche ST131 testée (TN03, clade C2) dans les reins et la vessie que celle d'UPEC non-ST131 comme CFT073, suggérant une meilleure capacité à coloniser l'arbre urinaire<sup>332</sup>. Totsika *et al.* ont montré qu'une souche de clade C2 était capable d'adhérer fortement aux cellules épithéliales vésicales, et qu'une forte expression du fimbriae de type 1, bien que favorable, n'était pas requise pour persister dans la vessie<sup>79</sup>.

Les infections du tractus urinaire peuvent être un moyen de transmission bactérienne *via* l'urine. Les conformations intracellulaires semblables à du biofilm sont une forme de persistance bactérienne dans la vessie, un état quiescent à partir duquel les bactéries peuvent à nouveau disséminer et entraîner une nouvelle infection<sup>336</sup>. Certaines souches d'UPEC sont capables d'entraîner des bactériuries asymptomatiques ; il a été décrit, lors de bactériuries asymptomatiques chez des écolières et des adultes hospitalisés, que les souches responsables appartenaient en majorité au ST73, mais aussi au ST131 pour les souches nosocomiales<sup>337</sup>. Ces souches semblaient avoir évolué vers un commensalisme urinaire par accumulation de gènes de virulence, comme ceux codant l'alpha-hémolysine (*hlyA*), le facteur nécrosant cytotoxique (*cnf1*), l'aérobactine (*iutA*), le récepteur de la yersiniabactine (*fyuA*), les fimbriaes de type P et F1C, et la colibactine (*pks*), leur permettant une colonisation fortuite, un transport à long terme et une évacuation soutenue supérieure à 10<sup>5</sup> UFC/mL d'urine<sup>337</sup>. Les UPEC responsables de bactériuries asymptomatiques peuvent ainsi essaimer quotidiennement dans l'environnement *via* l'urine, à des taux pouvant avoisiner les 10<sup>9</sup> bactéries/mL d'urine, non loin donc, des quantités de *E. coli* que peuvent contenir un gramme de fèces (10<sup>7</sup>-10<sup>9</sup>)<sup>9,337</sup>.

<sup>336</sup> D. A. Rosen *et al.*, PLoS medicine, **4**: e329, 2007.

<sup>337</sup> E. Salvador *et al.*, Infection and Immunity, **80**: 668–678, 2012.

# Études expérimentales

---

<b>I.</b>	<b>Problématiques et objectifs</b>	<b>68</b>
<b>II.</b>	<b>Étude préliminaire (travaux participatifs)</b>	<b>70</b>
II.1.	Contexte	70
II.2.	Méthodes	70
II.3.	Résultats	71
II.4.	Conclusion	71
II.5.	Participation personnelle à cette étude	72
II.6.	Article	72
<b>III.</b>	<b>Travaux personnels</b>	<b>93</b>
III.1.	Introduction	93
III.2.	Article	94

## I. Problématiques et objectifs

Le clone émergent *E. coli* ST131 présente les caractéristiques suivantes : (i) une distribution globale à l'échelle mondiale (ii) de multiples résistances aux antibiotiques (iii) une aptitude à coloniser et à persister au sein de ces hôtes au long court (iv) une transmissibilité démontrée (v) une pathogénicité et un fitness performant et (vi) est responsable d'infections sévères et récurrentes. Avec tous ces attributs, ST131 est considéré comme un clone international multirésistant à haut risque<sup>266</sup>. Nos travaux s'inscrivent dans ce contexte, où comprendre les paramètres qui ont mené au succès global de *E. coli* ST131 est devenu un enjeu majeur.

Le fitness se définissant par la capacité d'un micro-organisme à croître et se propager dans une population hôte, les souches ST131 sont par définition dotées d'un bon fitness, et en particulier celles appartenant au clade C émergent. Quelles sont les clefs de ce fitness accru ? Ce clone semble tout d'abord s'être adapté pour porter des gènes de résistance à moindre coût, que ce soit les mutations de gènes conférant la résistance aux fluoroquinolones ou des gènes codant la résistance aux C3G. Néanmoins, la résistance aux antibiotiques n'est pas indispensable au succès d'un clone, puisque des clones performants comme ST95 et ST73 sont sensibles aux antibiotiques. La capacité de colonisation de l'hôte et la virulence semblent par conséquent aussi importantes que la résistance, voire davantage, pour assurer la dominance d'un clone de *E. coli* en pathologie humaine. C'est ce sur quoi nous avons concentré nos travaux.

*E. coli* ST131 possède en moyenne, à résistance égale aux antibiotiques, un plus grand nombre de facteurs de virulence que les *E. coli* d'autres ST, mais sa plus grande virulence *in vivo* est controversée. Ce clone possède par ailleurs la capacité de coloniser les tractus intestinaux et urinaires. Notre intérêt prononcé pour les capacités d'adhésion et de colonisation de ST131 se fonde, en partie, sur une singularité du clade C : à savoir, l'inactivation, *via* l'insertion d'une séquence d'insertion, du gène *fimB* qui régule l'expression du fimbriae de type 1. En effet, chez *E. coli*, le fimbriae de type 1 joue un rôle primordial dans la colonisation intestinale et vésicale, permettant l'adhésion initiale aux épithéliums. Par conséquent, nous avons participé, en parallèle de nos travaux propres, à une étude exhaustive de la capacité de formation de biofilm au sein de l'espèce *E. coli*, que nous avons présentée ici comme étude préliminaire.

D'autre part, les souches appartenant au clade B de ST131 sont décrites en portage digestif et

comme responsables d'infections, mais n'ont pas connu l'essor mondial de leur descendant. Nous avons alors établi une approche originale qui consistait à comparer les *E. coli* ST131 de clade C, clade émergent, à leurs progéniteurs que sont les souches de clade B. Pour cela, nous avons étudié les différences de fitness des clades B et C, au regard de leurs capacités d'adhésion et de croissance *in vitro*, de leurs capacités de colonisation intestinale et urinaire et de leur virulence dans des modèles murins. Le but de nos travaux était de mettre ainsi en évidence des facteurs ayant contribué au succès des souches de clade C du ST131.

## II. Étude préliminaire (travaux participatifs)

### **Article : Association Between Kinetics of Early Biofilm Formation and Clonal Lineage in *Escherichia coli***

Saskia-Camille Flament-Simon, Marion Duprilot, Noémie Mayer, Vanesa García, María Pilar Alonso, Jorge Blanco and Marie-Hélène Nicolas-Chanoine

Frontiers in Microbiology. 2019 May 31, doi: [10.3389/fmicb.2019.01183](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01183)

#### II.1. Contexte

Au sein des ExPEC, la formation de biofilm a été majoritairement étudiée chez les uropathogènes, et en ce qui concerne *E. coli* ST131, des résultats contradictoires ont été obtenus quant à la capacité de ce clone à former du biofilm. Dernièrement, plusieurs équipes, dont la nôtre, ont mis en évidence une hétérogénéité dans le phénotype de formation de biofilm au sein même de ST131, qui serait dépendante de l'expression de fimbriae de type I.

La présente étude s'est intéressée aux étapes précoces de la formation du biofilm, *i.e.* dans les 5 premières heures de la croissance bactérienne, chez une large collection d'isolats cliniques de *E. coli* provenant de différentes sources et de deux hôpitaux différents, en France et en Espagne.

#### II.2. Méthodes

Deux collections de *E. coli* ont été étudiées : une collection de 196 isolats cliniques de *E. coli* consécutifs (CEC) et non redondants (une souche par patient) obtenus en 2016 et une collection de 198 isolats cliniques de *E. coli* producteurs de BLSE (ESBLEC) obtenus en 2015. Ces deux collections provenaient des deux mêmes hôpitaux (l'Hôpital Beaujon en France et l'hôpital de Lugo en Espagne) et de sources variées (urine, bactériémie, bile, liquide d'ascite abcès, ...).

La technique du Biofilm Ring Test<sup>®</sup> a été utilisée pour mesurer la cinétique précoce de formation de biofilm de ces isolats à 2, 3 et 5 h d'incubation, au regard de la valeur de l'index de formation de biofilm (BFI).

Les isolats étudiés ont, par ailleurs, été caractérisés au regard de la production de BLSE, des phylogroupes, des ST, des clonotypes *fumC-fimH* et des gènes codant les facteurs de virulence des ExPEC. Connaissant le rôle des fimbriae de type I dans la phase initiale de formation du biofilm, et la présence d'une séquence d'insertion dans le gène *fimB* des souches de *E. coli* ST131 de clade C (*fimH30*), le gène *fimB* de 127 souches choisies au hasard a été recherché et, si présent, séquencé.

### II.3. Résultats

Sur la base à la fois des niveaux de production de biofilm à 2, 3 et 5 h et de la cinétique individuelle de formation de biofilm au cours des 5 h, les isolats CEC et ESBLEC se distribuaient dans trois groupes phénotypiques de niveau de production : fort producteurs (G1), producteurs modérés (G2) et faibles/non producteurs (G3). À 2 h d'incubation, les souches de G1 et G2 étaient plus fréquentes au sein des CEC qu'au sein des ESBLEC et, à l'inverse, les souches de G3 étaient plus fréquentes au sein de ESBLEC. Comme les isolats de CEC et ESBLEC dénotaient une cinétique individuelle de formation de biofilm similaire au sein de chaque groupe, la comparaison des caractéristiques des isolats de chacun des groupes a été faite sur l'ensemble des isolats (CEC et ESBLEC confondus), et ce, à 2 h, compte tenu que la distribution des isolats dans les trois groupes était la plus représentative à ce temps. Les souches de groupe phylogénétique B2 étaient plus fréquentes dans le G1 que dans le G3. Les 394 isolats contenaient 153 clones, dont 31 comprenaient au moins trois isolats. Les clones B2-CH14-2-ST127, B2-CH40-22-ST131, B2-CH52-5/14-ST141, et E-CH100-96-ST362 étaient associés au G1 (41,7% des isolats), et le clone B2-CH40-30-ST131 au G3 (25,5% des isolats). La moyenne des gènes codant des VFs était plus élevée au sein du G1 qu'au sein du G3. Le variant FimB-P2 était associé au G1, et le variant FimB-P1 était associé à la formation de biofilm précoce. Les caractéristiques significativement associées à la formation de biofilm précoce étaient la lignée clonale principalement, puis certains VFs ainsi que FimB.

### II.4. Conclusion

Parmi les caractéristiques significativement associées à la formation de biofilm précoce chez *E. coli*, la lignée clonale se trouvait être la plus appropriée pour expliquer la variabilité de cette formation. Cette étude souligne, par ailleurs, que seul un nombre limité de clones de *E. coli*, avec pour dominants les clones ST141, ST127 et CH40-22, sont capables de former du biofilm précoce de manière stable et rapide. Différents précédents travaux avaient identifiés ces clones en situation de colonisateurs dominants chez les mammifères et les oiseaux. Cette étude confirme également

les précédents travaux montrant que la production de biofilm précoce était plus importante chez les isolats ST131 de clade B (*fimH22*) que chez les isolats de clade C (*fimH30*). Cette perte de compétence chez le clade C pourrait être vue comme un trait adaptatif d'évolution dans la lignée ST131 pour atteindre de nouvelles niches écologiques.

## **II.5. Participation personnelle à cette étude**

Mon travail personnel dans cette étude a été de mettre en place la technique du Biofilm Ring Test® dans le laboratoire de l'hôpital Beaujon, de l'enseigner à Saskia Flament en stage de trois mois dans ce laboratoire, puis de réaliser avec elle les ajustements et adaptations techniques. J'ai également collaboré au choix des analyses statistiques, à l'interprétation des résultats et à la relecture du manuscrit.

## **II.6. Article**





# Association Between Kinetics of Early Biofilm Formation and Clonal Lineage in *Escherichia coli*

Saskia-Camille Flament-Simon<sup>1</sup>, Marion Duprilot<sup>2,3</sup>, Noémie Mayer<sup>2</sup>, Vanesa García<sup>1</sup>, María Pilar Alonso<sup>4</sup>, Jorge Blanco<sup>1</sup> and Marie-Hélène Nicolas-Chanoine<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli*, Departamento de Microbiología e Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Spain, <sup>2</sup> Service de Microbiologie, Hôpital Beaujon, AP-HP, Clichy, France, <sup>3</sup> IAME, UMR 1137, INSERM, Université Paris Diderot, Paris, France, <sup>4</sup> Unidade de Microbiología, Hospital Universitario Lucus Augusti, Lugo, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Giovanna Batoni,  
University of Pisa, Italy

### Reviewed by:

David Šmajš,  
Masaryk University, Czechia  
Minh Duy Phan,  
The University of Queensland,  
Australia

### \*Correspondence:

Marie-Hélène Nicolas-Chanoine  
marie-helene.nicolas-chanoine@inserm.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Infectious Diseases,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 06 February 2019

**Accepted:** 09 May 2019

**Published:** 31 May 2019

### Citation:

Flament-Simon S-C, Duprilot M,  
Mayer N, García V, Alonso MP,  
Blanco J and Nicolas-Chanoine M-H  
(2019) Association Between Kinetics  
of Early Biofilm Formation and Clonal  
Lineage in *Escherichia coli*.  
Front. Microbiol. 10:1183.  
doi: 10.3389/fmicb.2019.01183

**Background:** *Escherichia coli* biofilm formation has mostly been assessed in specific pathogenic *E. coli* groups. Here, we assessed the early biofilm formation (EBF), i.e., adhesion stage, using the BioFilm Ring Test® on 394 *E. coli* clinical isolates (EC) [196 consecutively isolated (CEC) in 2016 and 198 ESBL-producing *E. coli* (ESBLEC) isolated in 2015]. Then, biofilm-forming ability was contrasted with phylogroups, clonotypes (*fumC-fimH*), and sequence types (STs), all being used to define clones, virulence factors (VF), and FimB.

**Result:** According to both biofilm production levels at 2, 3, and 5 h, and EBF kinetics over 5 h, CEC and ESBLEC isolates segregated into three EBF groups: strong (G1), moderate (G2), and weak (G3) producers. At 2 h, strong producers were more frequent among CEC ( $n = 28$ ; 14.3%) than among ESBLEC ( $n = 8$ ; 4%) ( $P = 0.0004$ ). As CEC and ESBLEC isolates showed similar individual EBF kinetics in each group, a comparison of isolate features between each group was applied to gathered CEC and ESBLEC isolates after 2 h of incubation, 2 h being the most representative time point of the CEC and ESBLEC isolate segregation into the three groups. Phylogroup B2 displayed by 51.3% of the 394 isolates was more frequent in G1 (77.8%) than in G3 (47.6%) ( $P = 0.0006$ ). The 394 isolates displayed 153 clones, of which 31 included at least three isolates. B2-CH14-2-ST127, B2-CH40-22-ST131, B2-CH52-5/14-ST141, and E-CH100-96-ST362 clones were associated with G1 ( $P < 0.03$ ) and accounted for 41.7% of G1 isolates. B2-CH40-30-ST131 clone was associated with G3 ( $P < 0.0001$ ) and accounted for 25.5% of G3 isolates. VF mean was higher among G1 than among G3 isolates ( $P < 0.001$ ). FimB-P2 variant was associated with G1 ( $P = 0.0011$ ) and FimB-P1 variant was associated with G3 ( $P = 0.0023$ ). Clone, some VF, and FimB were associated with EBF, with clonal lineage being able to explain 72% of the variability of EBF.

**Conclusion:** Among our 394 isolates, <10% are able to quickly and persistently produce high biofilm levels over 5 h. These isolates belong to a few clones previously

described in various studies as dominant gut colonizers in mammals and birds and comprised the B2-CH40-22-ST131 clone, i.e., the ancestor of the globally disseminated B2-CH40-30-ST131 clone that is the dominant clone among the weak biofilm producers.

**Keywords:** *E. coli*, early biofilm formation, phenotypes, virulence factors, clones, ST131, ST127, ST141

## INTRODUCTION

Since the first definition of biofilms provided by Costerton et al. (1978) 30 years ago, it is well established that the majority of bacteria found in nature exists attached to surfaces within the structured biofilm ecosystem (Costerton et al., 1978; Hall-Stoodley et al., 2004). Bacterial biofilms are known for their resistance to antibiotics, disinfectants, and components of the innate and adaptive inflammatory defense system of the body (Høiby et al., 2011). Accordingly, biofilm-growing bacteria cause chronic infections, persisting inflammation, tissue damage, and foreign body infections (Høiby et al., 2011). Thus, it was shown that persistence of staphylococcal infections related to foreign bodies is due to biofilm formation (Sabaté Brescó et al., 2017). Likewise, chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections in cystic fibrosis patients are caused by biofilm-growing mucoid isolates (Høiby et al., 2010).

Concerning *Escherichia coli*, which can exist as a harmless commensal in the mammalian digestive tract and as a pathogen causing significant morbidity and mortality worldwide, its ability to form biofilm has been extensively studied from non-pathogenic *E. coli* K12 strains (Beloin et al., 2008). With regard to pathogenic *E. coli*, biofilm involvement in pathogenesis has been well defined in diarrheagenic *E. coli*, notably enteroaggregative *E. coli* (Sheikh et al., 2001; Sherlock et al., 2004; Schiebel et al., 2017) and in adherent-invasive *E. coli* that have been implicated in the origin and perpetuation of Crohn's disease (Martinez-Medina et al., 2009b). Production of biofilm by extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) was mostly assessed in uropathogenic *E. coli* (Watts et al., 2010; Ponnusamy et al., 2012; Agarwal et al., 2013; Tapiainen et al., 2014). All these studies highlighted various biofilm formation phenotypes among uropathogenic *E. coli* including isolates obtained from patients with an indwelling catheter. Assessment of biofilm formation focusing on the pandemic extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing and multidrug-resistant ST131 *E. coli* clone (Nicolas-Chanoine et al., 2014) showed highly contrasting results: very low levels (Novais et al., 2012) and moderate levels (Hussain et al., 2014) of biofilm formation. Sarkar et al. (2016) studying ST131 isolates expressing or non-expressing type 1 fimbriae showed that biofilm growth depended on type 1 fimbriae expression and assay conditions. We recently showed different phenotypes among ST131 isolates according to their *fimH* allele encoding adhesins of type 1 fimbriae, namely, significant higher levels of early biofilm production by isolates of ST131 H22 subclone than those of ST131 H30 subclone (Nicolas-Chanoine et al., 2017).

In the present study, we assessed biofilm formation in 394 clinical isolates obtained from different sources in two geographically distant hospitals and during the same time

periods. We focused on the early biofilm formation (EBF), i.e., at adhesion stage, because this stage is the key stage in the colonization process of abiotic and biotic surfaces, body biotic surfaces being the epithelia of the various organs for the ExPEC isolates and mucus layers in gut, i.e., the *E. coli* natural habitat, for all *E. coli* populations (Ellermann and Sartot, 2018). For this, we used the BioFilm Ring Test<sup>®</sup>, a microbead immobilization assay adapted from Chavant et al.'s (2007) method that was shown to have a good concordance with the crystal violet method (Di Domenico et al., 2016) and offers a reproducible and quantifiable measure of the first step of biofilm formation. Expecting, as previously described, different biofilm formation phenotypes among our isolates, the main goal of this study was to molecularly characterize the isolates that enabled us to show that some traits are associated with the different phenotypes.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacteria

Two collections of *E. coli* clinical isolates were studied. The first collection consisted of 196 non-duplicate (one isolate per patient) *E. coli* consecutively isolated (CEC) in 2016 from two hospitals (Lugo hospital in Spain,  $n = 100$ , and Beaujon hospital in France,  $n = 96$ ). This collection that comprised 13 ESBL-producing isolates came from different sources: 146 from urine, 22 from blood, 5 from bile, 3 from ascitic fluid, 6 from abscesses, and 14 from various other sources. As ESBL production is currently one of the most important worldwide threatening mechanisms of antibiotic resistance in *E. coli* clinical isolates, we studied a second collection consisting of 198 non-duplicate ESBL-producing *E. coli* (ESBLEC) isolates obtained from the same two hospitals in 2015 (Lugo hospital,  $n = 99$ , and Beaujon hospital,  $n = 99$ ). This collection comprised 147 isolates from urine, 26 from blood, 7 from bile, 4 from ascitic fluid, 2 from abscesses, and 12 from various other sources. ESBL production detected by the double disk synergy test (Jarlier et al., 1988) performed in the two hospitals had been confirmed by specific ESBL PCR and sequencing as previously described (Leflon-Guibout et al., 2008; Mora et al., 2018).

### Determination of Early Biofilm Formation

The kinetics of EBF was assessed using the BioFilm Ring Test<sup>®</sup> (BioFilm Control, Saint-Beauzire, France) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, each isolate was twice sub-cultured on brain heart infusion (BHI) agar (Benton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France) at 37°C for 24 h. Three colonies of the second subculture on BHI agar were

suspended in BHI broth (Biofilm Control). Suspension was standardized to an optical density at 600 nm of  $1.00 \pm 0.05$  (Ultraspex10: Biochrom, Cambridge, United Kingdom) and then diluted at 1:250 in BHI broth to obtain a final concentration of approximately  $10^6$  UFC/ml. The bacterial suspension was supplemented (1% vol/vol) with magnetic microbeads (TONER 4, Biofilm Control) and 200  $\mu$ l of the mix was deposited in two wells of three polystyrene 96-well microtiter plates that were incubated for 2, 3, and 5 h, respectively. At the end of each incubation time, 100  $\mu$ l of liquid contrast solution (LIC001, Biofilm Control) was added on the top of each well and the microplate was put on a magnetic block for 1 min. After magnet contact, free beads were attracted toward the center of each well, forming a brown spot, while beads embedded in biofilms were blocked and remained undetectable. Each microplate was scanned using a BioFilm Control plate reader. The intensity of the spot was analyzed using the BioFilm Ring Test<sup>®</sup>-software version 3.0.3 and expressed as a biofilm formation index (BFI) with values ranging from 20 (non-formation of biofilm) to 0 (high formation of biofilm) that is inversely proportional to attached bacteria that block the beads. BFI values  $\leq 5$  mean that the isolates are strong biofilm producers; BFI values between 6 and 14, moderate producers; BFI values between 15 and 19, weak producers; non-producers display a BFI value of 20. Each isolate was tested in three independent experiments and the average of the six measures was used as the final BFI value. For each experiment, isolates S250 and 39 previously described with the method carried out in the present study as strong and negative producers of biofilm, respectively, were used as controls (Nicolas-Chanoine et al., 2017). We also included BHI broth without bacteria as negative control.

### Molecular Characterization of Isolates

As previously described, phylogroups (Clermont et al., 2013), sequence types (STs) according to the MLST scheme of Achtman<sup>1</sup>, *fumC* (C), and *fimH* (H) clonotypes (Weissman et al., 2012), and virulence factors (VF) (Mora et al., 2018) were determined in all 394 *E. coli* isolates. Clones were characterized by using the association of phylogroup, clonotype, and ST. Among the 394 isolates, 127 (approximately one-third of the 394 isolates) were randomly selected by using the RAND function (Microsoft Excel) system for the *fimB* gene analysis. The *fimB* gene was amplified with specific primers (FimB F: 5'-AGCATGGCGTTTGTATGG-3'; FimB R: 5'-CCCTGGTATCTCAACTATCTCT-3') and sequenced as previously described (Nicolas-Chanoine et al., 2017). When the *fimB* gene was disrupted, the detection of the previously described IS3-like in H30 R isolates (Totsika et al., 2011; Nicolas-Chanoine et al., 2017) was performed by PCR using specific primers designed in this study (FimBw F: 5'-AGCATGGCGTTTGTATGG-3'; IS R: 5'-CTGAATGTGATGTGCCGATG-3'). Phylogenetic tree of FimB variants was constructed by the UPGMA method of MEGA 6.

<sup>1</sup><http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>

### Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA) test was performed to compare the mean number of virulence genes and the association of variables with biofilm formation phenotypes. Dichotomous variables were described using enumeration and percentage, and compared using two-tailed Fisher's exact test. *P*-values  $< 0.05$  were considered statistically significant. Correlation between quantitative variables was assessed by Pearson correlation coefficient, and the assessment of repeatability was via the Bland and Altman (1986) statistical method. All analyses were carried out by XLSTAT statistical software<sup>2</sup>.

### Nucleotide Sequence Accession Numbers

The 34 *fimB* gene sequences have been registered in GenBank database under the following accession numbers: MK301552 to MK301585.

## RESULTS

### Kinetics of Early Biofilm Formation

To assess the repeatability of the duplicate determination of biofilm formation performed on each of the 394 isolates at each time, we calculated Pearson's correlation coefficient and Bland and Altman (1986) analysis between the BFI obtained for each determination. Pearson's correlation coefficient was high and constant over time: 0.96 at 2 h, 0.96 at 3 h, and 0.95 at 5 h (Supplementary Figure S1A), and the Bland and Altman (1986) analysis showed that only 3.4% of values at 2 h, 5.5% at 3 h, and 6.8% at 5 h exceed the established standard deviation (Supplementary Figure S1B).

Biofilm formation index values obtained at each time point (2, 3, and 5 h) showed a distribution of both CEC and ESBLEC isolates in the three levels of biofilm production (strong, moderate, and weak production) defined according to the BFI value ranges. After 2 h of incubation, strong producers (BFI: 0–5) and moderate producers (BFI: 6–14) were more frequent among CEC isolates than ESBLEC isolates ( $P = 0.004$  and  $P = 0.0189$ , respectively), whereas weak and non-producers (BFI: 15–20) were more frequent among ESBLEC isolates than among CEC isolates ( $P < 0.0001$ ) (Table 1). After 3 h of incubation, such significant differences were still observed between CEC and ESBLEC isolates for the strong and weak producers but not for the moderate producers. After 5 h of incubation, no significant difference was observed between CEC and ESBLEC for the three types of producers.

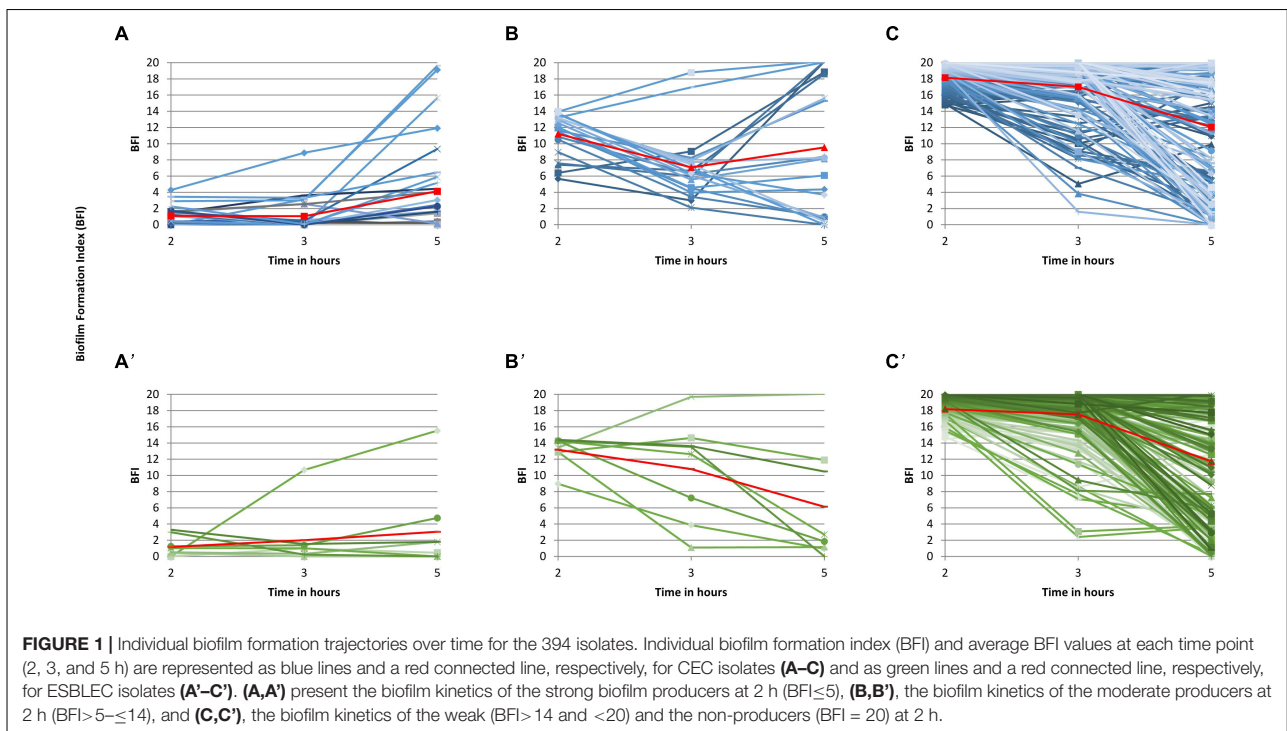
The study of individual BFI trajectories of the isolates of the three 2-h groups over time showed that both CEC and ESBLEC isolates displayed three distinct EBF kinetics. As indicated in Figures 1A,A', most of the 28 CEC (27 non-ESBL producers) and the 8 ESBLEC strong biofilm producers at 2 h (average BFI: 1 for the two collections) remained strong producers after 3 h (average BFI: 1 and 2, respectively) and 5 h (average

<sup>2</sup><https://www.xlstat.com>

**TABLE 1** | Distribution of CEC and ESLEC isolates according to the biofilm index (BFI) values after 2, 3, and 5 h of incubation.

BFI range	Number (%) of isolates		P-value <sup>a</sup>	Number (%) of isolates		P-value <sup>a</sup>	Number (%) of isolates		P-value <sup>a</sup>
	At 2 h			At 3 h			At 5 h		
	CEC n = 196	ESBLEC n = 198	CEC n = 196	ESBLEC n = 198	CEC n = 196	ESBLEC n = 198			
0–5	28 (14.3)	8 (4.0)	0.0004	36 (18.4)	11 (5.6)	< 0.0001	71 (36.2)	70 (35.4)	0.9164
6–14	20 (10.2)	8 (4.0)	0.0189	39 (19.9)	27 (13.6)	0.1064	41 (20.9)	45 (22.7)	0.7150
15–20	148 (75.5)	182 (91.9)	< 0.0001	121 (61.7)	160 (80.8)	< 0.0001	84 (42.9)	83 (41.9)	0.9188

<sup>a</sup>Two-tailed P-values by Fisher's exact test.



**FIGURE 1** | Individual biofilm formation trajectories over time for the 394 isolates. Individual biofilm formation index (BFI) and average BFI values at each time point (2, 3, and 5 h) are represented as blue lines and a red connected line, respectively, for CEC isolates (A–C) and as green lines and a red connected line, respectively, for ESBLEC isolates (A'–C'). (A,A') present the biofilm kinetics of the strong biofilm producers at 2 h (BFI ≤ 5), (B,B'), the biofilm kinetics of the moderate producers at 2 h (BFI > 5–≤ 14), and (C,C'), the biofilm kinetics of the weak (BFI > 14 and < 20) and the non-producers (BFI = 20) at 2 h.

BFI: 4 and 3, respectively) of incubation. Accordingly, these isolates were classified into group 1 (G1) corresponding to quickly and persistently strong biofilm producers. As indicated in **Figures 1B,B'**, the 20 CEC and 8 ESBLEC moderate producers at 2 h, with average BFI values of 11 and 13, respectively, displayed a wider variability of BFI values at 3 and 5 h than the strong producers. However, their average BFI at 3 h (7 and 11, respectively) and at 5 h (10 and 6, respectively) led us to classify them as mostly moderate producers over the study period [group 2 (G2)]. As indicated in **Figures 1C,C'**, the 148 CEC and 182 ESBLEC weak producers at 2 h (average BFI: 18 for CEC and ESBLEC) also displayed a wide variability of BFI values at 3 and 5 h with a notable part of isolates becoming strong producers at 5 h. However, the average BFI values were 17 for CEC and 18 for ESBLEC isolates at 3 h, and 12 for CEC and ESBLEC isolates at 5 h. Accordingly, we classified these isolates into group G3 corresponding to weak biofilm producers. We compared the individual BFI trajectories of all CEC isolates and

CEC isolates over time without the 13 ESBL-producing isolates identified in this collection and found no significant difference (data not shown).

**Figure 1** shows that time point 2 h was the most representative time point of the division of our *E. coli* population into three groups. Accordingly, the comparisons between G1, G2, and G3 isolates will be made at time point 2 h in the rest of the study. Furthermore, the similarity of the individual biofilm formation kinetics of the CEC and ESBLEC isolates within each group led us to characterize altogether the CEC and ESBLEC isolates of each group in the rest of the study.

### Characterization of Phylogroups, Sequence Types, and Clones

#### Phylogroups

Most of the 394 isolates (51.3%) were assigned to phylogroup B2. The remaining isolates were distributed into phylogroups A

(15.0%), B1 (9.6%), C (9.6%), E (5.1%), F (5.1%), and D (4.3%). Isolates belonging to phylogroup B2 were predominant among G1, G2, and G3 isolates (**Figure 2**). The seven phylogroups (A, B1, B2, C, D, E, and F) were detected among G3 isolates, four (A, B1, B2, and D) among G2 isolates, and four (B1, B2, E, and F) among G1 isolates (**Figure 2**). Isolates belonging to phylogroup B2 were more frequent among G1 isolates (77.8%) than among G3 isolates (47.6%) ( $P = 0.0006$ ) (**Supplementary Table S1**). By contrast, isolates belonging to phylogroups A and C were significantly more frequent among G3 isolates than among G1 isolates (A: 16.1% vs. 0%,  $P = 0.0098$ ; C: 11.5% vs. 0%,  $P = 0.0419$ ) (**Supplementary Table S1**).

### Sequence Types

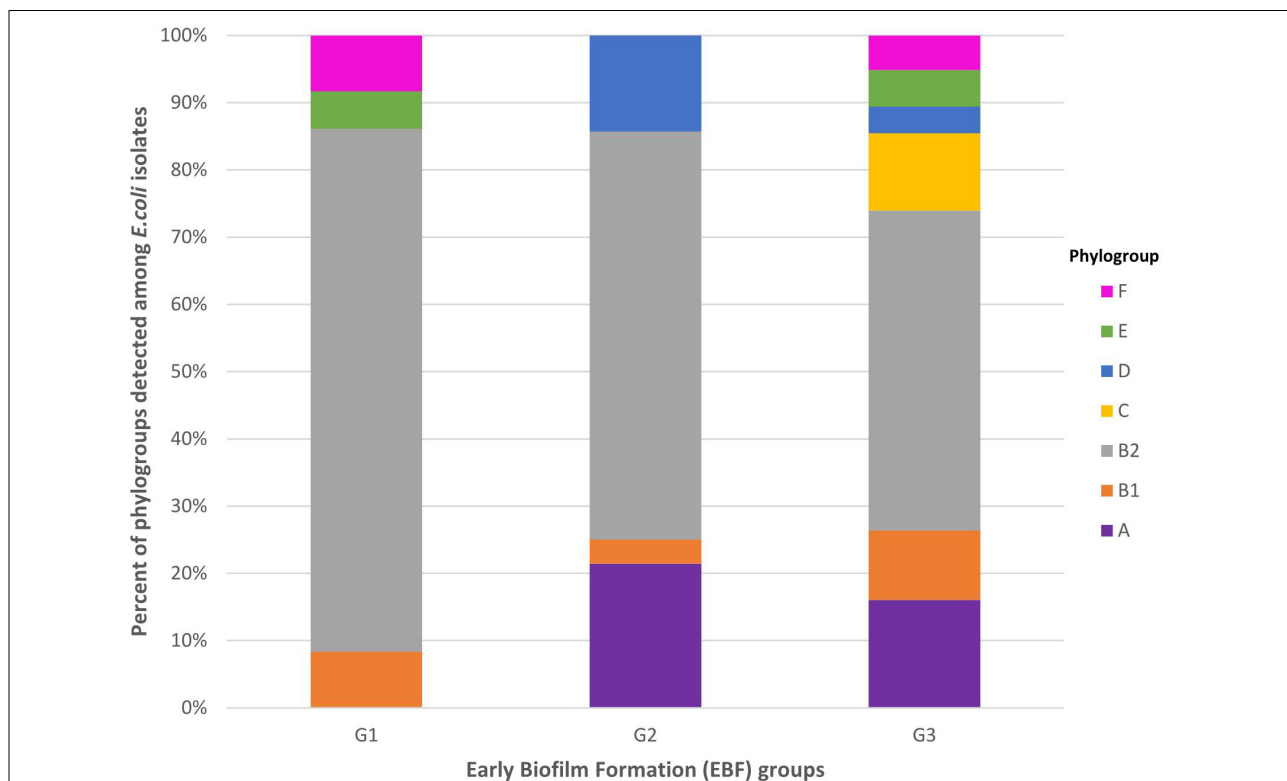
The 394 *E. coli* isolates displayed 99 STs. The most frequent STs accounting for more than half (52.0%) of the isolates were ST131 (26.4%), ST73 (5.6%), ST10 (4.3%), ST88 (4.3%), ST141 (4.1%), ST69 (3.8%), and ST95 (3.6%). The distribution of the seven most frequent STs among G1, G2, and G3 isolates is presented in **Figure 3**. These seven STs were displayed by G3 isolates whereas five were displayed by G2 isolates (absence of ST88 and ST95) and only three (ST131, ST141, and ST73) were displayed by G1 isolates. Among the three STs shared by the three groups, ST131 was significantly more frequent

among G3 isolates than among G1 isolates (29.4% vs. 11.1%,  $P = 0.0289$ ). By contrast, ST141 was more frequent among G1 isolates than among G3 (25.0% vs. 1.5%,  $P < 0.0001$ ) (**Supplementary Table S2**).

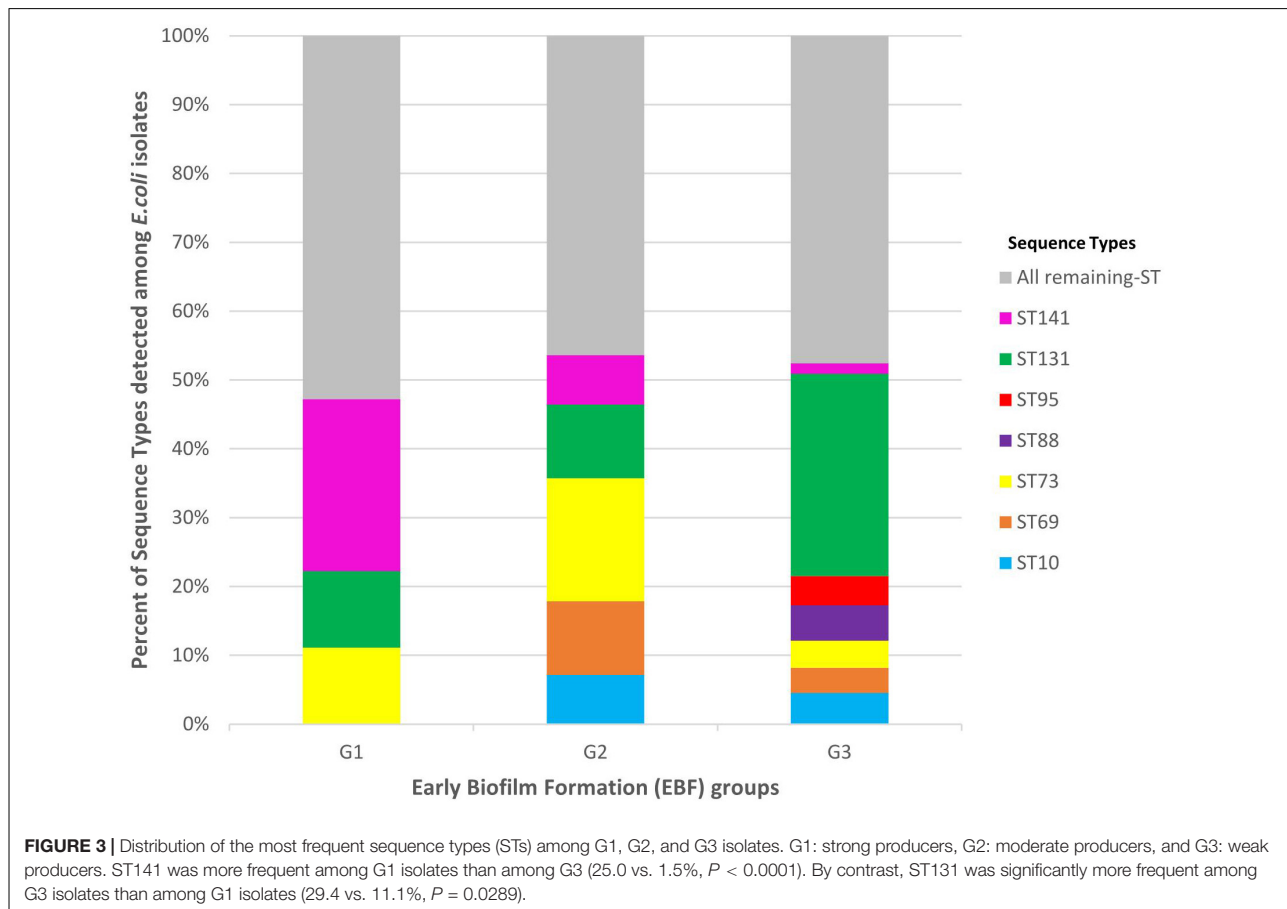
### Clones

A total of 153 clones were identified among the 394 isolates, with 31 of them including at least 3 isolates (**Figure 4** and **Supplementary Table S3**) and 6 including at least 10 isolates: B2-CH40-30-ST131 (87 isolates), D-CH35-27-ST69 (14 isolates), B2-CH52-5-ST141 (13 isolates), C-CH4-39-ST88 (11 isolates), A-CH11-54-ST10 (10 isolates), and B2-CH40-41-ST131 (10 isolates). The 36 G1 isolates belonged to 26 clones (**Supplementary Table S4**). These 26 clones were also found in 25% of the G2 isolates ( $P < 0.0001$ ) and in only 5.2% of the G3 isolates ( $P < 0.0001$ ) (**Supplementary Table S4**).

Five clones (B2-CH14-2-ST127, B2-CH40-22-ST131, B2-CH52-5-ST14, B2-CH52-14-ST141, and E-CH100-96-ST362) were associated with G1 and accounted for 41.7% of G1 isolates, 10.7% of G2 isolates ( $P = 0.0105$ ), and 2.4% of G3 isolates ( $P < 0.0001$ ) (**Supplementary Table S3**). Only the B2-CH40-30-ST131 clone was associated with G3, accounting for 25.5% of G3 isolates, 10.7% of G2 isolates ( $P = 0.1068$ ), and 0% of G1 isolates ( $P < 0.0001$ ) (**Supplementary Table S3**).



**FIGURE 2** | Distribution of phylogroups A, B1, B2, C, D, E, and F among G1, G2, and G3 isolates. G1: strong producers, G2: moderate producers, and G3: weak producers. Isolates belonging to phylogroup B2 were more frequent among G1 isolates (77.8%) than among G3 isolates (47.6%) ( $P = 0.0006$ ). By contrast, isolates belonging to phylogroups A and C were significantly more frequent among G3 isolates than among G1 isolates (A: 16.1 vs. 0%,  $P = 0.0098$ ; C: 11.5 vs. 0%,  $P = 0.0419$ ).



### Comparison of the Virulence Factor (VF)-Encoding Genes Among G1, G2, and G3 Isolates

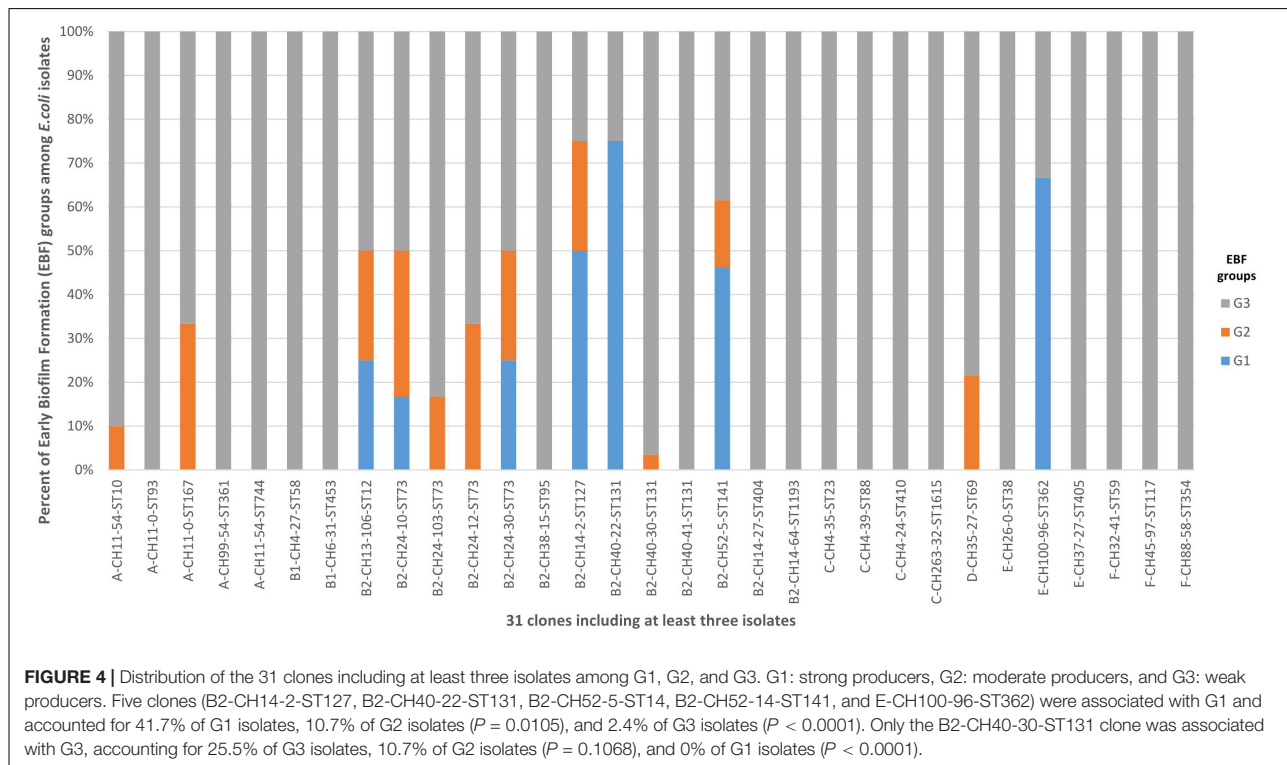
As indicated in **Table 2**, some VF-encoding genes were mostly observed among G1. These genes consisted of genes encoding adhesins (*papAH*, *papC*, *papEF*, *sfa/focDE*, and *yfcV*), genes encoding toxins (*cnf1*, *hlyA*, and *vat*), genes encoding two variants of group II capsule (*kpsM II-K5* and *neuC-K1*), and miscellaneous genes (*ibeA*, *malX*, and *ups*). Inversely, the *sat* and *traT* genes were mostly observed among G3 isolates. Concerning the genes encoding proteins involved in iron uptake, those encoding ferric aerobactin receptors (*iucD* and *iutA*) were significantly more frequent among G3 isolates than among G1 isolates, whereas it was the contrary for the *iroN* and *chuA* genes. Mean of VF-encoding genes was significantly higher among G1 isolates than among G3 isolates (13.8 vs. 10.4,  $P < 0.001$ ).

#### *fimB* Alleles

Given that the ST131 clone with a *fimH30* allele was the dominant clone among our *E. coli* population and that previous results had shown (i) an *IS3*-like-linked defective *fimB* gene encoding a co-factor of the regulation of the type 1 fimbriae synthesis in this clone (Totsika et al., 2011) and (ii)

the key role played by type 1 fimbriae in promoting biofilm formation in this clone (Sarkar et al., 2016), we analyzed the *fimB* gene in 127 isolates randomly selected among the 394 isolates. PCR experiments showed no *fimB* amplicon in 10 (7.9%) isolates (**Supplementary Table S5**) belonging to the following clones: A-CH11-0-ST93 ( $n = 2$ ), A-CH11-0-ST167 ( $n = 1$ ), A-CH99-54-ST361 ( $n = 1$ ), A-CH7-53-ST540 ( $n = 1$ ), A-CH7-54-ST540 ( $n = 1$ ), A-CH4-0-ST1284 ( $n = 1$ ), B1-CH4-0-ST155 ( $n = 1$ ), B2-CH38-92-ST421 ( $n = 1$ ), and E-CH26-0-ST38 ( $n = 1$ ). An expected amplicon was detected in 89 (70.1%) isolates and an amplicon with a higher size was detected in 28 (22.0%) isolates (**Supplementary Table S5**). Sequencing experiments showed the insertion of *IS3*-like in the *fimB* gene in these 28 (22%) isolates comprising 25 of the 26 selected CH40-30 ST131 isolates and the three selected CH24-30 ST73 isolates. Overall, an intact *fimB* gene was significantly more frequent among G1 isolates than among G3 isolates ( $P = 0.03$ ) (**Supplementary Table S5**).

Through *fimB* gene sequencing of the 89 isolates with an expected *fimB* amplicon, 34 *fimB* alleles were detected (**Supplementary Table S6**), of which 11 new variants compared with those currently registered in the GenBank database. These 34 alleles encoded 10 FimB proteins (P1 to P10) (**Supplementary Table S6**). Phylogenetic tree built with these 10 proteins



(Supplementary Figure S2) revealed two large clusters. One of these clusters included the 14 alleles encoding FimB P1 and the other one included the eight alleles encoding FimB P2. FimB P2 and the closely related FimB P3 (Supplementary Figure S2) were associated with G1 and accounted for 69.2% of G1 isolates vs. 10.6% of G3 isolates ( $P < 0.0001$ ). Inversely, FimB P1 was associated with G3, accounting for 69.7% of G3 isolates vs. 23.1% of G1 isolates ( $P = 0.0023$ ) (Figure 5 and Supplementary Table S7).

### Correlation Between Biofilm Production and Bacterial Characteristics

The one-way ANOVA test using the individual BFI of 394 isolates showed that clonal lineage explained 72% of the EBF variability and FimB, 28%. Among the VF-encoding genes significantly associated with biofilm production, the *sfa/focDE*, *cnf1*, *hlyA*, *vat*, and *iroN* genes were those explaining from 8 to 16% of the variability of early biofilm production. Isolate source was not associated with the EBF.

## DISCUSSION

Our study that assessed the early biofilm production, i.e., adhesion stage of 394 *E. coli* clinical isolates obtained from different sources, at the same time periods, in two distant hospitals (Spanish and French hospitals), is in accordance with previous studies with regard to the wide spectrum of biofilm formation within ExPEC (Ponnusamy et al., 2012;

Agarwal et al., 2013; Mostafavi et al., 2018). Using the BioFilm Ring Test® like us, Olivares et al. (2016) found that *P. aeruginosa* causing infection in cystic fibrosis patients segregated into three groups (strong, moderate, and weak producers) at the early stage of biofilm formation. Accordingly, difference in ability to quickly adhere seems to exist within isolates of different bacterial species. The biofilm production displayed by our ESBLEC collection is also in accordance with that displayed by the ESBLEC collection recently published by Surgers et al. (2018), i.e., predominance of weak biofilm producers among ESBLEC.

The novelty provided by our study consisted of the molecular characterization of the 394 isolates with regard to phylogroups, clonal lineages, VF-encoding genes, and FimB, a co-factor of the regulation of the synthesis of type 1 fimbriae that are critical adhesins for *E. coli* biofilm formation (Beloin et al., 2008). Thus, we showed that among the characteristics significantly associated with EBF, clonal lineage was the most suitable characteristics to explain the variability of EBF. Association between clonal lineage and EBF phenotype has recently been shown among bone and joint infection *Staphylococcus aureus* isolates analyzed by using the BioFilm Ring Test® (Tasse et al., 2018).

Among the limited number (<10%) of our *E. coli* that quickly and persistently produced early biofilm at high levels (G1 isolates), five clones (B2-CH14-2-ST127, CH52-5, and CH52-14 sub-lineages of B2-ST141, B2-CH40-22-ST131, and E-CH100-96-ST362) accounted for 41.7% of the 36 G1 isolates. Notable features have previously been provided by different studies for these clones. The B2-ST127 clone, which is one of the dominant clones among uropathogenic isolates

**TABLE 2** | Virulence factor-encoding genes displayed by G1, G2, and G3 isolates.

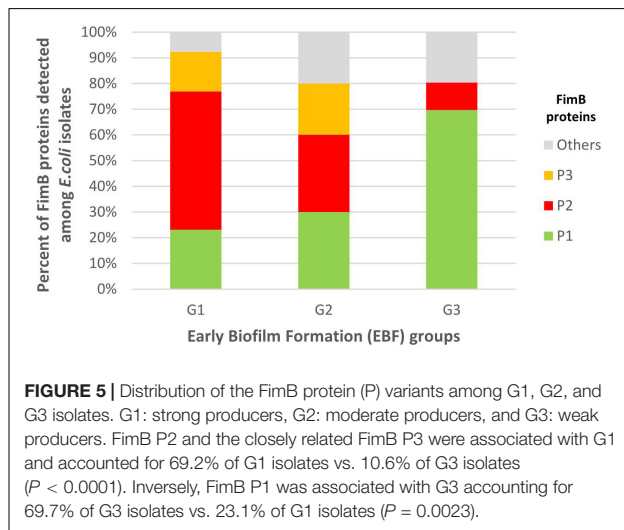
Gene/Status	Number (%) of isolates				P-value	
	Total n = 394	G1 n = 36	G2 n = 28	G3 n = 330	G1 vs. G2	G1 vs. G3
<b>Adhesin</b>						
<i>fimH</i>	383 (97.2)	36 (100)	27 (96.4)	320 (97)		
<i>fimAVMT78</i>	56 (14.2)	4 (11.1)	4 (14.3)	48 (14.5)		
<i>papAH</i>	135 (34.3)	19 (52.8)	12 (42.9)	104 (31.5)		0.0149 <sup>b</sup>
<i>papC</i>	140 (35.5)	20 (55.6)	12 (42.9)	108 (32.7)		0.0093 <sup>b</sup>
<i>papEF</i>	146 (37.1)	20 (55.6)	13 (46.4)	113 (34.2)		0.0168 <sup>b</sup>
<i>sfa/focDE</i>	69 (17.5)	22 (61.1)	9 (32.1)	38 (11.5)	0.0259 <sup>a</sup>	<0.0001 <sup>b</sup>
<i>afa/dra BC</i>	31 (7.9)	0 (0.0)	1 (3.6)	30 (9.1)		
<i>yfcV</i>	213 (54.1)	31 (86.1)	17 (60.7)	165 (50)	0.0396 <sup>a</sup>	<0.0001 <sup>b</sup>
<b>Toxin</b>						
<i>sat</i>	130 (33)	3 (8.3)	7 (25)	120 (36.4)		0.0006 <sup>b</sup>
<i>cnf1</i>	74 (18.8)	17 (47.2)	12 (42.9)	45 (13.6)		<0.0001 <sup>b</sup>
<i>hlyA</i>	80 (20.3)	17 (47.2)	13 (46.4)	50 (15.2)		<0.0001 <sup>b</sup>
<i>hlyF</i>	77 (19.5)	6 (16.7)	4 (14.3)	67 (20.3)		
<i>cdtB</i>	17 (4.3)	4 (11.1)	0 (0.0)	13 (3.9)		
<i>tsh</i>	21 (5.3)	2 (5.6)	2 (7.1)	17 (5.2)		
<i>vat</i>	99 (25.1)	23 (63.9)	15 (53.6)	61 (18.5)		<0.0001 <sup>b</sup>
<b>Iron uptake</b>						
<i>iucD</i>	237 (60.2)	8 (22.2)	13 (46.4)	216 (65.5)		<0.0001 <sup>b</sup>
<i>lutA</i>	239 (60.7)	8 (22.2)	13 (46.4)	218 (66.1)		<0.0001 <sup>b</sup>
<i>iroN</i>	129 (32.7)	25 (69.4)	14 (50)	90 (27.3)		<0.0001 <sup>b</sup>
<i>fyuA</i>	295 (74.9)	29 (80.6)	21 (75)	245 (74.2)		
<i>chuA</i>	260 (66)	33 (91.7)	21 (75)	206 (62.4)		0.0008 <sup>b</sup>
<b>Capsule</b>						
<i>KpsM II</i>	229 (58.1)	30 (83.3)	18 (64.3)	181 (54.8)		0.0011 <sup>b</sup>
<i>KpsM II-K2</i>	31 (7.9)	0 (0.0)	1 (3.6)	30 (9.1)		
<i>KpsM II-K5</i>	151 (38.3)	21 (58.3)	13 (46.4)	117 (35.5)		0.0105 <sup>b</sup>
<i>neuC-K1</i>	47 (11.9)	9 (25)	4 (14.3)	34 (10.3)		0.0153 <sup>b</sup>
<i>KpsM III</i>	8 (2.0)	0 (0.0)	1 (3.6)	7 (2.1)		
<b>Miscellaneous</b>						
<i>cvaC</i>	58 (14.7)	6 (16.7)	3 (10.7)	49 (14.8)		
<i>iss</i>	72 (18.3)	8 (22.2)	3 (10.7)	61 (18.5)		
<i>traT</i>	256 (65)	15 (41.7)	13 (46.4)	228 (69.1)		0.0014 <sup>b</sup>
<i>ibeA</i>	36 (9.1)	12 (33.3)	1 (3.6)	23 (7.0)	0.004 <sup>b</sup>	<0.0001 <sup>b</sup>
<i>malX</i>	226 (57.4)	31 (86.1)	17 (60.7)	178 (53.9)	0.0396 <sup>a</sup>	0.0003 <sup>b</sup>
<i>usp</i>	211 (53.6)	28 (77.8)	17 (60.7)	166 (50.3)		0.0024 <sup>b</sup>
<i>ompT</i>	282 (71.6)	30 (83.3)	22 (78.6)	230 (69.7)		
<b>Range</b>	1–23	1–23	1–20	1–22		
<b>Mean</b>	10.8	13.8	11.8	10.4	0.001 <sup>c</sup>	0.001 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Two-tailed P-values by Fisher's exact test are shown where  $P < 0.05$ . <sup>b</sup>Significant differences after applying the Bonferroni correction because of  $P < 0.025$ . <sup>c</sup>Analysis of variance (ANOVA test) was performed to compare the mean of virulence genes between the three groups.

(Yamaji et al., 2018), was shown to be shared by humans, dogs, and cats (Johnson et al., 2008) and to be a dominant gut colonizer of humans (Ulleryd et al., 2015) and fruit bats (Nowak et al., 2017). The B2-ST141 clone was characterized by Clermont et al. (2017) as a commensal clone, i.e., digestive tract resident with low level of human invasiveness, through a study assessing the pathogenesis of bacteriaemic *E. coli* by matching large collections of bacteriaemic (Lefort et al., 2011) and commensal isolates (Massot et al., 2016). Other studies showed that this clone

accounted for the gut dominant *E. coli* population of some healthy subjects (Leflon-Guibout et al., 2008; Nicolas-Chanoine et al., 2013) and was one of the dominant clones in the digestive tract of Antarctic pinnipeds (Mora et al., 2018). The B2-CH40-22 ST131 clone was shown to have similar features to the B2-CH52-5 ST141 clone with regard to healthy subjects (Nicolas-Chanoine et al., 2017) and Antarctic pinnipeds (Mora et al., 2018). It was also found in poultry digestive tract and retail chicken meat and was shown to be a foodborne uropathogen (Liu et al., 2018).





Concerning the E-CH100-96 ST362 clone, our study is, to our knowledge, the first one reporting the presence of this clone in humans. Indeed, it was identified so far in chicken (Cortes et al., 2010) and as an agent causing bovine mastitis (Freitag et al., 2017). Accordingly, most of these clones appear to be both ExPEC and intestinal dominant colonizers in some mammals and birds.

We found that some VF genes, including *papC*, *sfa/focDE*, *cnf1*, *hlyA*, and *ibeA*, were mostly identified in G1 isolates, i.e., strong biofilm producers. All these VFs had already been shown to be associated with *E. coli* strong biofilm producers (Naves et al., 2008), and two of them, *sfa/focDE* and *ibeA*, had been shown to be characteristic traits of adherent/invasive *E. coli* (AIEC) that are strong biofilm producers (Martinez-Medina et al., 2009b). The implication of AIEC in Crohn's disease (Darfeuille-Michaud et al., 2004) was notably based on their high biofilm production. Indeed, in an inflamed intestinal environment, their biofilm-related mucosal attachment could allow them to penetrate the inner mucus layer and adhere to the epithelial surface, thus enabling more direct stimulation of epithelial and immune cells (Glasser et al., 2001; Ellermann and Sartot, 2018). It is interesting to note here that Martinez-Medina et al. (2009a) found two ST131 isolates carrying the *ibeA* gene in the AIEC collection that they compared with ExPEC isolates. This finding suggests that it would be of interest to investigate all the AIEC phenotypic and genotypic features in our strong biofilm producers (Camprubí-Font et al., 2019).

The present study in which a wide collection of *E. coli* isolates was analyzed confirms the results that we previously obtained with few isolates about the difference in early biofilm production between B2-CH40-22 ST131 and B2-CH40-30-ST131 clones, i.e., strong and weak production, respectively (Nicolas-Chanoine et al., 2017). Knowing that the B2-CH40-22 ST131 clone is the ancestor of the globally disseminated B2-CH40-30-ST131 clone (Ben Zakour et al., 2016), the loss of the ability to strongly produce biofilm at the early step of biofilm formation by the B2-CH40-30-ST131

clone could appear as an evolutionary adaptative trait in ST131 lineage.

In conclusion, this study highlights that the ability to quickly and persistently produce biofilm at high levels is a property displayed by a limited number of clones, some of which have been found in previous studies as dominant colonizers in some mammals and birds.

## ETHICS STATEMENT

Ethics approval was not required according to national and institutional guidelines.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

S-CF-S carried out biofilm assay and strain molecular characterizations, collected and analyzed the all data, and participated in manuscript writing. MD and NM collected and phenotypically characterized the French clinical isolates, and participated in both biofilm assay and strain molecular characterizations. VG participated in strain molecular characterizations. MA participated in isolation and characterization of the Spanish clinical isolates. JB supervised the strain molecular analyses, data collection, and statistical analyses, and participated in manuscript writing. M-HN-C designed the research, supervised the overall project, and wrote the manuscript. All authors provided critical input and approved the manuscript submission.

## FUNDING

This study was supported by grants received by the Spanish team from (i) projects PI16/01477 from Plan Estatal de I+D+I 2013–2016, Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación, Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO, Spain); (ii) Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER); and (iii) ED431C 2017/57 (Grupos de referencia competitiva) from the Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria and Consellería de Economía, Emprego e Industria (Xunta de Galicia) and FEDER. It was also supported by a grant received by the French team from Project JPI-EC-AMR 2016, with l'Agence Nationale de la Recherche (France) as sponsor (No. ANR-16-JPEC-0002-04).

## ACKNOWLEDGMENTS

S-CF-S thanks the Secretaría General de Universidades, Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Gobierno de España for providing her with a grant from the FPU program (FPU15/02644). VG thanks the Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria and Consellería

de Economía, Empleo e Industria (Xunta de Galicia) for providing her with a grant from ED481B 2018/018; axuda á etapa de formación posdoutoral nas universidades do SUG. The authors also thank Delphine Bachelet for assistance in statistic interpretation.

## REFERENCES

- Agarwal, J., Mishra, B., Srivastava, S., and Srivastava, R. (2013). Genotypic characteristics and biofilm formation among *Escherichia coli* isolates from Indian women with acute cystitis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 107, 183–187. doi: 10.1093/trstmh/trs090
- Beloin, C., Roux, A., and Ghigo, J. M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, 249–289. doi: 10.1007/978-3-540-75418-3\_12
- Ben Zakour, N. L., Alsheikh-Hussain, A. S., Ashcroft, M. M., Khanh Nhu, N. T., Roberts, L. W., Stanton-Cook, M., et al. (2016). Sequential acquisition of virulence and fluoroquinolone resistance has shaped the evolution of *Escherichia coli* ST131. *mBio* 7:e347-16. doi: 10.1128/mBio.00347-16
- Bland, J. M., and Altman, D. G. (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1, 307–310. doi: 10.1016/s0140-6736(86)90837-8
- Camprubí-Font, C., Ewers, C., Lopez-Siles, M., and Martínez-Medina, M. (2019). Genetic and phenotypic features to screen for putative adherent-invasive *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 10:108. doi: 10.3389/fmicb.2019.00108
- Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., Talon, R., Hebraud, M., and Bernardi, T. (2007). A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J. Microbiol. Methods* 68, 605–612. doi: 10.1016/j.mimet.2006.11.010
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., and Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 58–65. doi: 10.1111/1758-2229.12019
- Clermont, O., Couffignal, C., Blanco, J., Mentré, F., Picard, B., Denamur, E., et al. (2017). Two levels of specialization bacteriaemic *Escherichia coli* strains revealed by their comparison with commensal strains. *Epidemiol. Infect.* 145, 872–882. doi: 10.1017/S0950268816003010
- Cortes, P., Blanc, V., Mora, A., Dahbi, G., Blanco, J. E., Blanco, M., et al. (2010). Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2799–2805. doi: 10.1128/AEM.02421-09
- Costerton, J. W., Geesey, G. G., and Cheng, K. J. (1978). How bacteria stick. *Sci. Am.* 238, 86–95. doi: 10.1038/scientificamerican0178-86
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., et al. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127, 412–421. doi: 10.1053/j.gastro.2004.04.061
- Di Domenico, E. G., Toma, L., Provot, C., Ascenzioni, F., Sperduti, I., Prignano, G., et al. (2016). Development of an in vitro assay, based on the biofilm ring test, for rapid profiling of biofilm-growing bacteria. *Front. Microbiol.* 7:1429. doi: 10.3389/fmicb.2016.01429
- Ellermann, M., and Sartot, R. B. (2018). Intestinal bacterial biofilms modulate mucosal immune responses. *J. Immunol. Sci.* 2, 13–18. doi: 10.29245/2578-3009/2018/2.1122
- Freitag, C., Michael, G. B., Kadlec, K., Hassel, M., and Schwarz, S. (2017). Detection of plasmid-borne extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) genes in *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 200, 151–156. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.08.010
- Glasser, A. L., Boudeau, J., Barnich, N., Perruchot, M. H., Colombel, J. F., and Darfeuille-Michaud, A. (2001). Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect. Immun.* 69, 5529–5537. doi: 10.1128/iai.69.9.5529-5537.2001
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., and Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95–108. doi: 10.1038/nrmicro821
- Hoiby, N., Ciofu, O., and Bjarnsholt, T. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol.* 5, 1663–1674. doi: 10.2217/fmb.10.125
- Hoiby, N., Ciofu, O., Johansen, H. K., Song, Z., Moser, C., Jensen, P. Ø, et al. (2011). The clinical impact of bacterial biofilms. *Int. J. Oral Sci.* 3, 55–65. doi: 10.4248/IJOS11026
- Hussain, A., Ranjan, A., Nandanwar, N., Babbar, A., Jadhav, S., and Ahmed, N. (2014). Genotypic and phenotypic profiles of *Escherichia coli* isolates belonging to clinical sequence type 131 (ST131), clinical non-ST131, and fecal non-ST131 lineages from India. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7240–7249. doi: 10.1128/AAC.03320-14
- Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., and Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10, 867–878. doi: 10.1093/clinids/10.4.867
- Johnson, J. R., Johnston, B., Clabots, C. R., Kuskowski, M. A., Roberts, E., and DebRoy, C. (2008). Virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* serogroup O6 isolates from humans, dogs, and cats. *J. Clin. Microbiol.* 46, 417–422. doi: 10.1128/JCM.00674-07
- Leflon-Guibout, V., Blanco, J., Amaqdouf, K., Mora, A., Guize, L., and Nicolas-Chanoine, M. H. (2008). Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, among fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area of Paris. *France J. Clin. Microbiol.* 46, 3900–3905. doi: 10.1128/JCM.00734-08
- Lefort, A., Panhard, X., Clermont, O., Woerther, P. L., Branger, C., Mentre, F., et al. (2011). Host factors and portal of entry overcome bacterial determinants to predict the severity of *Escherichia coli* bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* 49, 777–783. doi: 10.1128/JCM.01902-10
- Liu, C. M., Stegger, M., Aziz, M., Johnson, T. J., Waits, K., Nordstrom, L., et al. (2018). *Escherichia coli* ST131-H22 as a foodborne uropathogen. *mBio* 9:e470-18. doi: 10.1128/mBio.00470-18
- Martínez-Medina, M., Mora, A., Blanco, M., Lopez, C., Alonso, M. P., Bonacorsi, S., et al. (2009a). Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3968–3979. doi: 10.1128/JCM.01484-09
- Martínez-Medina, M., Naves, P., Blanco, J., Aldeguer, X., Blanco, J. E., Blanco, M., et al. (2009b). Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC). *BMC Microbiol.* 9:202. doi: 10.1186/1471-2180-9-202
- Massot, M., Daubié, A.-S., Jauréguy, F., Couffignal, C., Dahbi, G., Mora, A., et al. (2016). Phylogenetic, virulence and antibiotic resistance characteristics of commensal strain populations of *Escherichia coli* from community subjects in the Paris area in 2010 and evolution over 30 years. *Microbiology* 162, 642–650. doi: 10.1099/mic.0.000242
- Mora, A., García-Pena, F. J., Alonso, M. P., Pedraza-Díaz, S., Ortega-Mora, L. M., García-Parraga, D., et al. (2018). Impact of human-associated clonal groups in antarctic pinnacleds: presence of ST73, ST95, ST141 and ST131. *Sci. Rep.* 8:4678. doi: 10.1038/s41598-018-22943-0
- Mostafavi, S. K. S., Najar-Peerayeh, S., Mobarez, A. M., and Parizi, M. K. (2018). Detection of virulence factors, phylogroups, serogroups and biofilm formation among CTX-M-1 positive *Escherichia coli* isolated from patients with pyelonephritis. *Biomed. Res.* 29, 1543–1549.
- Naves, P., del Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., Blanco, J., et al. (2008). Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. *Microb. Pathog.* 45, 86–91. doi: 10.1016/j.micpath.2008.03.003
- Nicolas-Chanoine, M.-H., Bertrand, X., and Madec, J.-Y. (2014). *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 543–574. doi: 10.1128/CMR.00125-13
- Nicolas-Chanoine, M.-H., Gruson, C., Bialek-Davenet, S., Bertrand, X., Thomas-Jean, F., Bert, F., et al. (2013). 10-Fold increase (2006–11) in the rate of healthy subjects with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* faecal

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01183/full#supplementary-material>

- carriage in a Parisian check-up centre. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 562–568. doi: 10.1093/jac/dks429
- Nicolas-Chanoine, M.-H., Petitjean, M., Mora, A., Mayer, N., Lavigne, J.-P., Boulet, O., et al. (2017). The ST131 *Escherichia coli* H22 subclone from human intestinal microbiota: comparison of genomic and phenotypic traits with those of the globally successful H30 subclone. *BMC Microbiol.* 17:71. doi: 10.1186/s12866-017-0984-8
- Novais, A., Pires, J., Ferreira, H., Costa, L., Montenegro, C., Vuotto, C., et al. (2012). Characterization of globally spread *Escherichia coli* ST131 isolates (1991 to 2010). *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3973–3976. doi: 10.1128/AAC.00475-12
- Nowak, K., Fahr, J., Weber, N., Lübke-Becker, A., Semmler, T., Weiss, S., et al. (2017). Highly diverse and antimicrobial susceptible *Escherichia coli* display a naïve bacterial population in fruit bats from the republic of congo. *PLoS One* 12:e0178146. doi: 10.1371/journal.pone.0178146
- Olivares, E., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Jaulhac, B., Prévost, G., Bernardi, T., et al. (2016). The biofilm ring test: a rapid method for routine analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation kinetics. *J. Clin. Microbiol.* 54, 657–661. doi: 10.1128/JCM.02938-15
- Ponnusamy, P., Natarajan, V., and Sevanan, M. (2012). In vitro biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* and their antimicrobial susceptibility pattern. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 5, 210–213. doi: 10.1016/S1995-7645(12)60026-1
- Sabaté Brecsó, M., Harris, L. G., Thompson, K., Stanic, B., Morgenstern, M., O'Mahony, L., et al. (2017). Pathogenic mechanisms and host interactions in *Staphylococcus epidermidis* device-related infection. *Front. Microbiol.* 8:1401. doi: 10.3389/fmicb.2017.01401
- Sarkar, S., Vagenas, D., Schembri, M. A., and Totsika, M. (2016). Biofilm formation by multidrug resistant *Escherichia coli* ST131 is dependent on type 1 fimbriae and assay conditions. *Pathog. Dis.* 74:ftw013. doi: 10.1093/femspd/ftw013
- Schiebel, J., Böhm, A., Nitschke, J., Burdukiewicz, M., Weinreich, J., Ali, A., et al. (2017). Genotypic and phenotypic characteristics associated with biofilm formation by human clinical *Escherichia coli* isolates of different pathotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 83:e1660-17. doi: 10.1128/AEM.01660-17
- Sheikh, J., Hicks, S., Dall'Agnol, M., Phillips, A. D., and Nataro, J. P. (2001). Roles for *fis* and *yafk* in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 41, 983–997. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02512.x
- Sherlock, O., Schembri, M. A., Reisner, A., and Klemm, P. (2004). Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. *J. Bacteriol.* 186, 8058–8065. doi: 10.1128/JB.186.23.8058-8065.2004
- Surgers, L., Boyd, A., Girard, P.-M., Arlet, G., and Decré, D. (2018). Biofilm formation by ESBL-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Int. J. Med. Microbiol.* 309, 13–18. doi: 10.1016/j.ijmm.2018.10.008
- Tapiainen, T., Hanni, A.-M., Salo, J., Ikäheimo, I., and Uhari, M. (2014). *Escherichia coli* biofilm formation and recurrences of urinary tract infections in children. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 33, 111–115. doi: 10.1007/s10096-013-1935-4
- Tasse, J., Trouillet-Assant, S., Josse, J., Martins-Simões, P., Valour, F., Langlois-Jacques, C., et al. (2018). Association between biofilm formation phenotype and clonal lineage in *Staphylococcus aureus* strains from bone and joint infections. *PLoS One* 13:e0200064. doi: 10.1371/journal.pone.0200064
- Totsika, M., Beatson, S. A., Sarkar, S., Phan, M. D., Petty, N. K., Bachmann, N., et al. (2010). Insights into a multidrug resistant *Escherichia coli* pathotype of the globally disseminated ST131 lineage: Genome analysis and virulence mechanisms. *PLoS One* 6:e26578. doi: 10.1371/journal.pone.0026578
- Ulleryd, P., Sandberg, T., Scheutz, F., Clabots, C., Johnston, B. D., Thuras, P., et al. (2015). Colonization with *Escherichia coli* strains among female sex partners of men with febrile urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1947–1950. doi: 10.1128/JCM.00579-15
- Watts, R. E., Hancock, V., Ong, C.-L. Y., Vejborg, R. M., Mabbett, A. N., Totsika, M., et al. (2010). *Escherichia coli* isolates causing asymptomatic bacteriuria in catheterized and noncatheterized individuals possess similar virulence properties. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2449–2458. doi: 10.1128/JCM.01611-09
- Weissman, S. J., Johnson, J. R., Tchesnokova, V., Billig, M., Dykhuizen, D., Riddell, K., et al. (2012). High-resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1353–1360. doi: 10.1128/AEM.06663-11
- Yamaji, R., Rubin, J., Thys, E., Friedman, C. R., and Riley, L. W. (2018). Persistent pandemic lineages of uropathogenic *Escherichia coli* in a college community from 1999 to 2017. *J. Clin. Microbiol.* 56:e1834-17. doi: 10.1128/JCM.01834-17

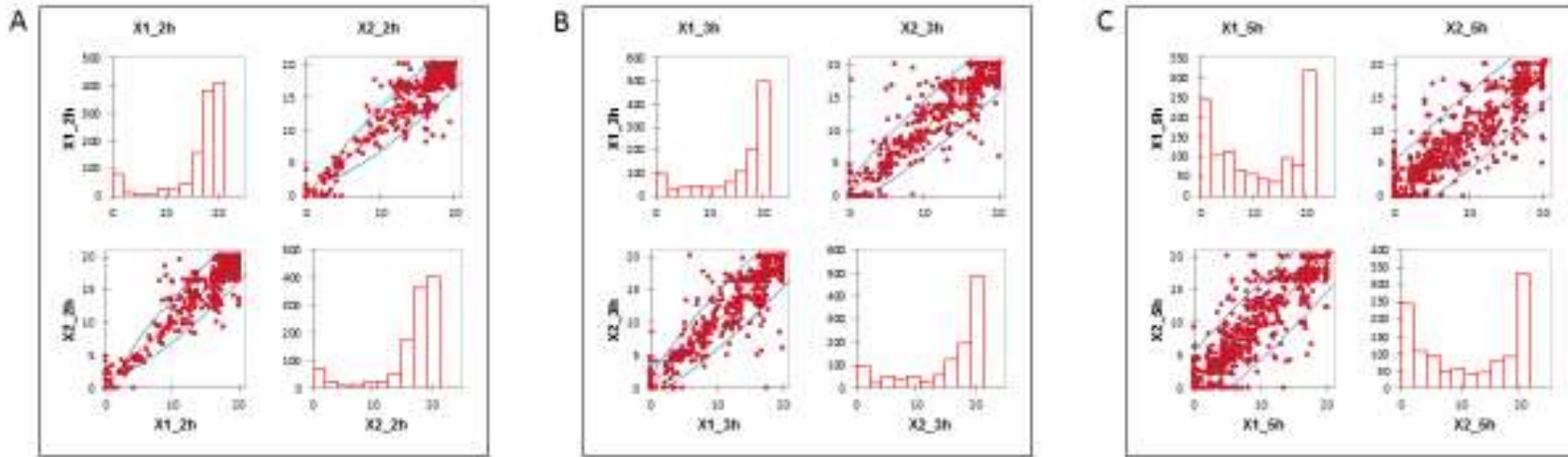
**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Flament-Simon, Duprilot, Mayer, García, Alonso, Blanco and Nicolas-Chanoine. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

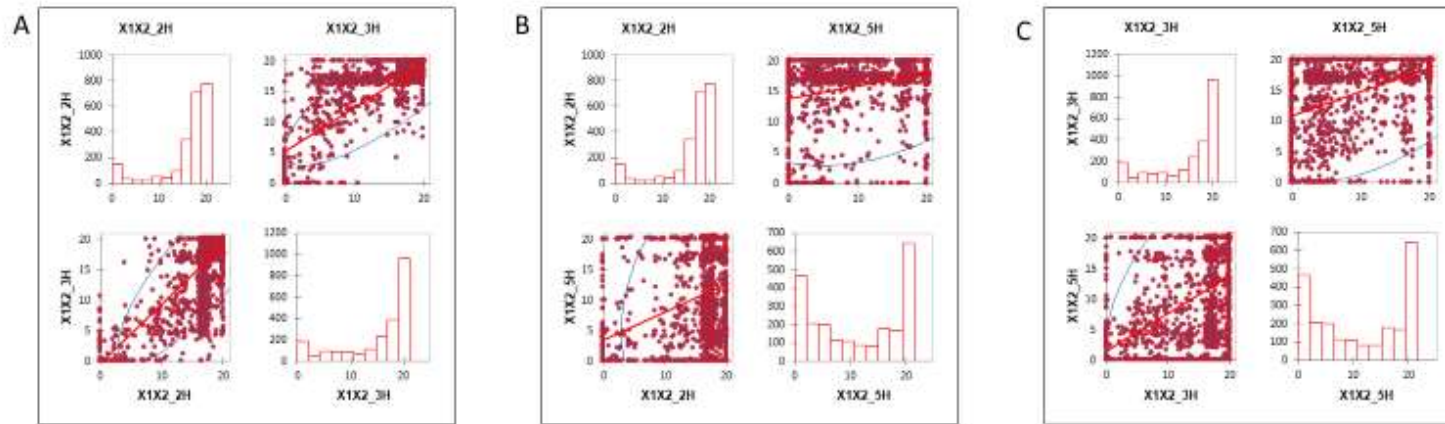
**Association between kinetic of early biofilm formation and clonal lineage in  
*Escherichia coli***

**Saskia-Camille Flament Simon<sup>1</sup>, Marion Duprilot<sup>2,3</sup> Noémie Mayer<sup>2</sup>, Vanesa García<sup>1</sup>,  
María Pilar Alonso<sup>4</sup>, Jorge Blanco<sup>1</sup>, Marie-Hélène Nicolas-Chanoine<sup>3</sup>**

Are presented six figures illustrating (i) correlation analyses (ii) distribution of various characters according to *E. coli* collections and biofilm formation phenotypes and (iii) phylogenetic tree of FimB variants, and two tables providing (i) G1, G2 and G3 clone distributions at 2h and 5h and (ii) *fimB* and FimB sequences.

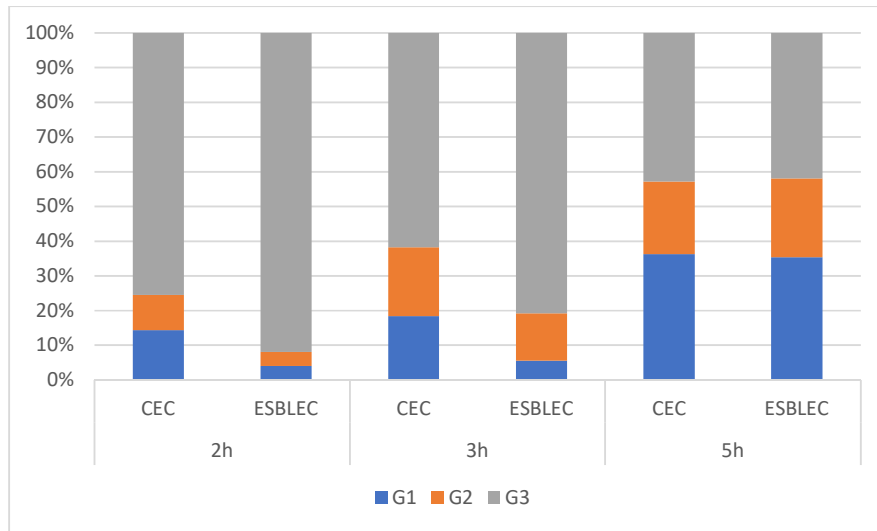


**Figure S1: Pearson's correlation between the two BFI values obtained for each of the 394 *E. coli* isolates. A:  $0.96 \pm 1.76$  at 2h, B:  $0.96 \pm 2.15$  at h and C:  $0.95 \pm 2.76$  at 5h**

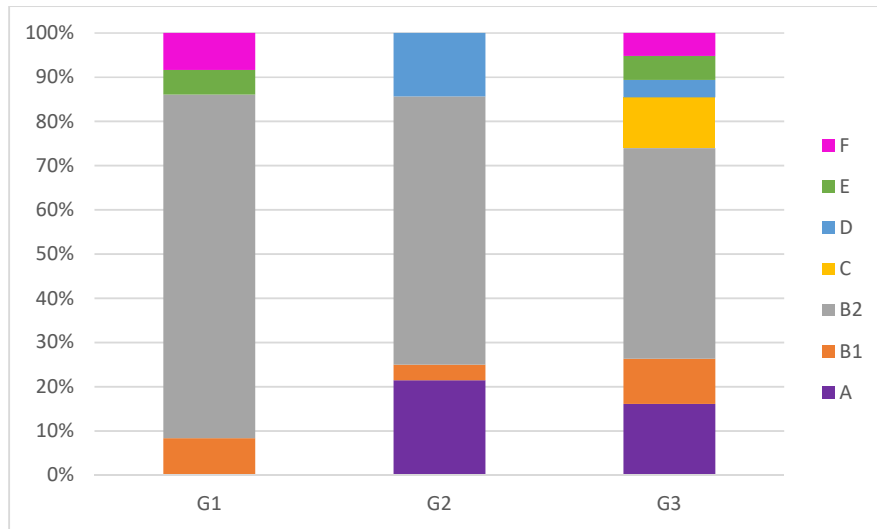


**Figure S2. Pearson's correlation coefficient between BFI values at the different time points**

A: 2h versus 3h (0.828), B: 2h versus 5h (0.315) and C: 3h versus 5h (0.487).

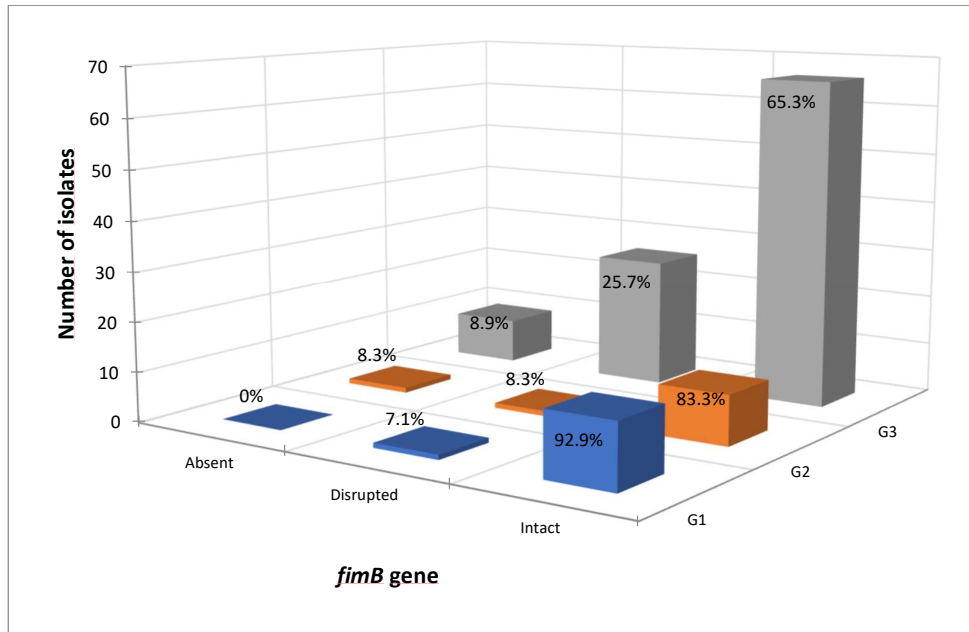


**Figure S3. Distribution of G1, G2 and G3 isolates in CEC and ESBLEC at each time point.** G1: strong producers, G2: moderate producers and G3: weak producers.

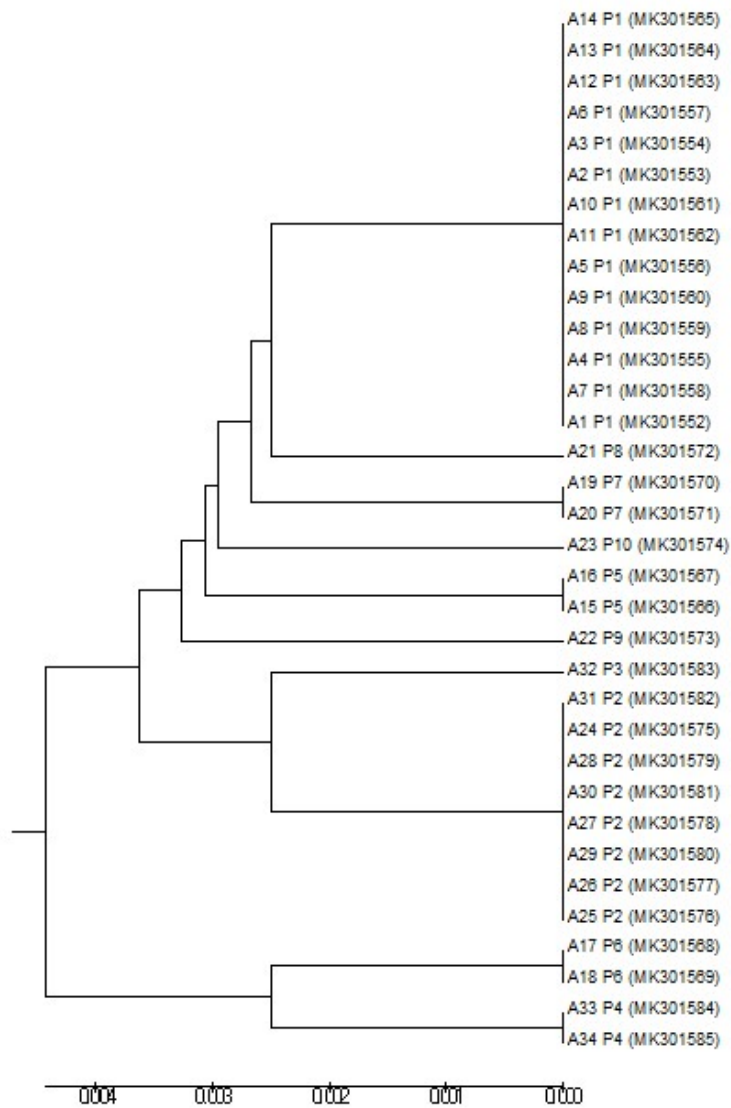


**Figure S4. Distribution of phylogroups A, B1, B2, C, D, E and F amongst G1, G2 and G3 isolates. G1: strong producers, G2: moderate producers and G3: weak producers.**





**Figure S5. *fimB* gene status according to biofilm formation groups G1, G2 and G3 amongst 127 isolates randomly selected. Percentages (%) of each *fimB* status (absent, disrupted and intact) within G1, G2 and G3 are presented.**



**Figure S6. Phylogenetic tree of FimB (sequences available in Table S2).**

In parenthesis are indicated the access number of the sequences registered in GenBank database

**Table S1. Comparative distribution of the 31 dominant clones in G1, G2 and G3 at 2h and 5h**

Clone	Number (%) of isolates			P value G1-2h vs G3-2h	Number (%) of isolates			P value <sup>a</sup>	
	G1-2h n=36	G2-2h n=28	G3-2h n=330		G1-5h n=141	G2-5h n=86	G3-5h n=167	G1-5h vs G3-5h	G1-2h vs G1-5h
A-CH11-54-ST10	0 (0.0)	1 (3.6)	9 (2.7)		4 (2.8)	2 (2.3)	4 (2.4)		
A-CH11-0-ST93	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (1.2)		0 (0.0)	0 (0.0)	4 (2.4)		
A-CH11-0-ST167	0 (0.0)	1 (3.6)	2 (0.6)		1 (0.7)	1 (1.2)	1 (0.6)		
A-CH99-54-ST361	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (1.5)		0 (0.0)	1 (1.2)	4 (2.4)		
A-CH11-54-ST744	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (1.5)		1 (0.7)	1 (1.2)	3 (1.8)		
B1-CH4-27-ST58	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (1.2)		0 (0.0)	1 (1.2)	3 (1.8)		
B1-CH6-31-ST453	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.9)		0 (0.0)	1 (1.2)	2 (1.2)		
B2-CH13-106-ST12	1 (2.8)	1 (3.6)	2 (0.6)		1 (0.7)	1 (1.2)	2 (1.2)		
B2-CH24-10-ST73	1 (2.8)	2 (7.1)	3 (0.9)		3 (2.1)	1 (1.2)	2 (1.2)		
B2-CH24-103-ST73	0 (0.0)	1 (3.6)	5 (1.5)		4 (2.8)	2 (2.3)	0 (0.0)	0.0429	
B2-CH24-12-ST73	0 (0.0)	1 (3.6)	2 (0.6)		2 (1.4)	0 (0.0)	1 (0.6)		
B2-CH24-30-ST73	1 (2.8)	1 (3.6)	2 (0.6)		1 (0.7)	0 (0.0)	3 (1.8)		
B2-CH38-15-ST95	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (1.8)		0 (0.0)	1 (1.2)	5 (3.0)		
B2-CH14-2-ST127	2 (5.6)	1 (3.6)	1 (0.3)	0.0265	3 (2.1)	0 (0.0)	1 (0.6)		
B2-CH40-22-ST131	3 (8.3)	0 (0.0)	1 (0.3)	0.0033	2 (1.4)	1 (1.2)	1 (0.6)		
B2-CH40-30-ST131	0 (0.0)	3 (10.7)	84 (25.5)	<0.0001	25 (17.7)	16 (18.6)	46 (27.5)	0.0430	0.0053.
B2-CH40-41-ST131	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (3.0)		7 (5.0)	2 (2.3)	1 (0.6)	0.0259	
B2-CH52-5-ST141	6 (16.7)	2 (7.1)	5 (1.5)	0.0002	6 (4.3)	3 (3.5)	4 (2.4)		
B2-CH14-27-ST404	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.9)		0 (0.0)	2 (2.3)	1 (0.6)		
B2-CH14-64-ST1193	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (1.2)		2 (1.4)	1 (1.2)	1 (0.6)		
C-CH4-35-ST23	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.9)		3 (2.1)	0 (0.0)	0 (0.0)		
C-CH4-39-ST88	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (3.3)		1 (0.7)	3 (3.5)	7 (4.2)		
C-CH4-24-ST410	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (2.1)		4 (2.8)	1 (1.2)	2 (1.2)		
C-CH263-32-ST1615	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (1.8)		4 (2.8)	2 (2.3)	0 (0.0)	0.0429	
D-CH35-27-ST69	0 (0.0)	3 (10.7)	11 (3.3)		3 (2.1)	5 (5.8)	6 (3.6)		
E-CH26-0-ST38	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.9)		0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.8)		
E-CH100-96-ST362	2 (5.6)	0 (0.0)	1 (0.3)	0.0265	2 (1.4)	1 (1.2)	0 (0.0)		
E-CH37-27-ST405	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (1.2)		1 (0.7)	3 (3.5)	0 (0.0)		
F-CH32-41-ST59	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (1.2)		0 (0.0)	0 (0.0)	4 (2.4)		
F-CH45-97-ST117	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.9)		1 (0.7)	2 (2.3)	0 (0.0)		
F-CH88-58-ST354	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (1.5)		1 (0.7)	3 (3.5)	1 (0.6)		

<sup>a</sup> Two-tailed *P* values by Fisher's exact test are shown where *P* < 0.05.

**Table S2. Nucleotide and amino acid differences in 34 *fimB* alleles detected in 84 *Escherichia coli* clinical isolates.**

Strain/FimB/accession n°	Nucleotide position																																Amino acid position																
	39	57	72	80	93	103	114	117	156	198	237	246	249	256	285	294	297	315	319	324	330	339	345	384	396	402	485	495	498	519	537	540	556	570	573	579	580	#	27	35	86	107	162	180	186	195			
A1 P1 (MK301552)	G	A	A	C	A	T	T	G	T	A	C	G	T	G	C	G	C	G	G	T	A	G	G	C	C	G	A	T	G	T	C	T	G	A	C	A	C	C	T	Y	V	V	Q	N	G	Q			
A22 P9 (MK301573)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.
A7 P1 (MK301558)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	A	.	G	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
A16 P5 (MK301567)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	A	.	G	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.		
A4 P1 (MK301555)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
A8 P1 (MK301559)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
A9 P1 (MK301560)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
A23 P10 (MK301574)	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.			
A5 P1 (MK301556)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
A15 P5 (MK301566)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	C	.	.	.	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.			
A17 P6 (MK301568)	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	T	.	C	.	.	.	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	.	.	.	.	.			
A11 P1 (MK301562)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
A10 P1 (MK301561)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	C	.	.	.	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
A2 P1 (MK301553)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	C	.	.	.	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
A19 P7 (MK301570)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.			
A3 P1 (MK301554)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
A18 P6 (MK301569)	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	.	.	.	.	.			
A6 P1 (MK301557)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
A12 P1 (MK301563)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
A20 P7 (MK301571)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	T	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S			
A21 P8 (MK301572)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	T	T	.	.	T	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.			
A31 P2 (MK301582)	T	.	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	C	A	.	T	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.			
A24 P2 (MK301575)	.	.	T	.	T	.	A	A	C	.	.	.	C	A	.	T	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.			
A33 P4 (MK301584)	.	.	T	.	T	C	A	A	C	.	.	.	C	A	.	T	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	I	.	.	.	.	.	.			
A34 P4 (MK301585)	.	.	.	.	T	C	A	A	C	.	.	.	C	A	.	T	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	I	.	.	.	.	.	.			
A32 P3 (MK301583)	.	.	.	.	T	.	A	A	C	.	.	.	C	A	.	T	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	I	.	.	.	.	E		
A28 P2 (MK301579)	.	.	.	.	T	.	A	A	C	.	.	.	C	A	.	T	T	.	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.			
A30 P2 (MK301581)	.	.	.	.	T	.	A	A	C	.	.	.	C	A	.	T	T	.	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.			
A27 P2 (MK301578)	.	.	.	.	T	.	A	A	C	.	.	.	C	A	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.			
A29 P2 (MK301580)	.	.	.	.	T	.	A	A	C	.	.	.	C	A	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.			
A26 P2 (MK301577)	.	.	.	.	T	.	A	A	C	.	.	.	C	A	.	T	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.			
A25 P2 (MK301576)	.	.	.	.	T	.	A	A	C	.	.	.	C	A	.	T	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.			
A14 P1 (MK301565)	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	A	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	G	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
A13 P1 (MK301564)	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	A	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				

### III. Travaux personnels

## Le succès de *Escherichia coli* ST131 O25b:H4 associé à une diminution de la virulence

### III.1. Introduction

Nos travaux s'inscrivent dans l'étude de l'évolution du clone ST131, prenant comme ligne directrice la comparaison des souches du clade émergent, le clade C, avec leurs progénitrices, les souches du clade B. En effet, peu d'études se sont intéressées aux souches non productrices de BLSE et sensibles aux fluoroquinolones au sein du ST131, et par conséquent, aux souches du clade B. Une étude récente de Kallonen *et al.* décrivant la cinétique de prévalence des principaux ST de *E. coli* responsables de bactériémies entre 2001 et 2012 dépeint l'apparition du ST131 au début des années 2000, et le décrit comme responsable de 14,4% de la totalité des bactériémies sur la période étudiée<sup>133</sup>. Nous avons tout d'abord utilisé cette collection pour étudier la proportion de chaque sous-clade du ST131 O25b parmi les *E. coli* responsables bactériémies, et en particulier, leur cinétique d'évolution dans la période étudiée. Cette étude nous a permis d'observer, bien qu'attendue, la large prédominance des souches de clade C, mais également de mettre en évidence la persistance des souches de clade B dans les infections extra-intestinales.

Notre objectif était donc de comparer des souches des clades B et C au regard de leur fitness, et d'investiguer ainsi les rôles potentiels de facteurs autres que la résistance aux antibiotiques, notamment le taux de croissance, la formation de biofilm, la capacité de colonisation et la virulence, dans le succès de souches du clade C de ST131. À cette fin, nous avons tout d'abord constitué une collection de 39 souches de *E. coli* ST131 O25b:H4 diversifiée quant à l'origine géographique (France et Espagne), la source (souches de portage intestinal et souches de prélèvements cliniques) et au phénotype de résistance aux antibiotiques, collection qui s'est avérée, *via* l'analyse du génome entier, représentative de la diversité génotypique des sous-clades de ST131. Toutes les souches de cette collection ont été testées dans différentes expériences *in vitro* : estimation de la capacité de croissance en milieu riche, caractérisation de la formation de biofilm précoce par la technique Biofilm Ring Test®, de l'expression de fimbriae de type 1 par le yeast agglutination test et de la production de curli et de cellulose par le test au rouge Congo. Nous avons adapté le « yeast agglutination test » à

des temps de croissance courts, permettant l'étude de l'expression des fimbriae de type 1 à des temps précoces, correspondant aux temps utilisés dans la technique du BRT®. Par la suite, trois souches représentatives des clades B et C ont été sélectionnées au sein de notre collection puis soumises à des expériences en condition de compétition, de manière à mettre en évidence des différences fines de fitness. Le choix de ces souches s'est fondé sur l'histoire phylogénique de ST131, l'analyse des correspondances multiples, la capacité à former du biofilm précoce, le fitness individuel défini en milieu riche et la résistance aux antibiotiques. Ainsi, deux souches ont été sélectionnées car jugées représentatives de leur clade respectif : pour le clade B, une souche ancestrale (S250, de sous-clade B1, FimH22, sensible aux fluoroquinolones) nommée Ancêtre, et pour le clade C, une souche (CES164C, de sous-clade C1, FimH30, gène *fimB* inactivé par l'insertion de ISEc55 et résistante aux fluoroquinolones), nommée Émergente. Nous n'avons pas sélectionné de souche du sous-clade C2 pour nous affranchir d'un éventuel coût en fitness de la multirésistance, incluant la production de CTX-M-15, présente chez toutes les souches C2, dans les compétitions entre souches de clade B et C. Une deuxième souche de clade B, nommée Hybride (CES131C, de sous-clade B4, FimH30), a été également sélectionnée pour ces expériences de compétition. Ces souches ont été comparées en condition de compétition *in vitro* : croissance planctonique ou en biofilm mature, et *in vivo* dans trois modèles murins : colonisation intestinale, septicémie, infection urinaire. Enfin, connaissant l'existence d'une séquence d'insertion ISEc55 inactivant le gène *fimB* dans toutes les souches de clade C, nous avons construit des mutants  $\Delta fimB$  pour les deux souches de clade B sélectionnées ne possédant pas cette séquence d'insertion. La capacité à former du biofilm de ces mutants a été explorée, ainsi que leur comportement en compétition contre leurs souches mères respectives dans différents modèles murins.

### III.2. Article

## **Success of *Escherichia coli* O25b:H4 ST131 clade C associated with a decrease in virulence**

Marion DUPRILOT<sup>a,b,#</sup>, Alexandra BARON<sup>a</sup>, François BLANQUART<sup>a,c</sup>, Sara DION<sup>a</sup>,  
Philippe LETTERON<sup>d</sup>, Jorge BLANCO<sup>e</sup>, Olivier CLERMONT<sup>a</sup>, Erick DENAMUR<sup>a,f</sup>, Marie-  
Hélène NICOLAS-CHANOINE<sup>a,#</sup>

<sup>a</sup>: Université de Paris, INSERM, IAME, 75018 Paris

<sup>b</sup>: APHP, Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Beaujon, 92110 Clichy

<sup>c</sup>: Centre for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France, CNRS, INSERM, PSL Research University, Paris, France

<sup>d</sup>: Centre de Recherche sur l'Inflammation, INSERM, Paris, France.

<sup>e</sup>: Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli* (LREC), Departamento de Microbiología e Parasitología, Facultade de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela (USC), Lugo, Spain.

<sup>f</sup>: APHP, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Hôpital Bichât, 75018 Paris

#Address correspondence to:

Marion DUPRILOT, e-mail: [marion.duprilot@gmail.com](mailto:marion.duprilot@gmail.com)

Marie-Hélène NICOLAS-CHANOINE, e-mail: [marie-helene.nicolas-chanoine@inserm.fr](mailto:marie-helene.nicolas-chanoine@inserm.fr)

Running Head: Loss of virulence in the global emergent ST131 clade C

## **Abstract**

*Escherichia coli* of sequence type (ST) 131 resistant to fluoroquinolones and producer of CTX-M-15 is globally one of the major extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC). ST131 phylogenesis showed that multidrug-resistant ST131 strains belong to a clade called C, descending from an ancestral clade called B, comprising mostly antibiotic-susceptible strains. Antibiotic resistance could appear as one of the keys of the clade C global success. We hypothesized that other features of ST131 clade C could contribute to this success since other major global ExPEC clones (ST73, ST95) are mostly antibiotic-susceptible. To test this hypothesis, we measured the growth abilities, early biofilm formation and virulence-factor content of a collection of clade B and clade C strains. Moreover, using competition assays, we measured the capacity of selected representative strains of clades B and C to colonize the mouse intestine and urinary tract, and to kill mice in a septicemia model. Clade B and C strains had similar growth ability. However, clade B strains were more frequently early biofilm producers, expressed mostly faster their type 1 fimbriae and displayed more virulence factor-encoding genes than clade C strains. Clade B outcompeted clade C in the gut and/or urinary tract colonization models and in the septicemia model. These results strongly suggest that clade C strain evolution includes a loss of virulence, *i.e.* a process that could enhance micro-organism persistence in a given host and thus optimize transmission. This process, associated with acquired antibiotic-resistance, could ensure clade C strain survival in environments under antibiotic pressure.



## **Importance**

Extraintestinal pathogen *Escherichia coli* (ExPEC) are virulent but mostly antibiotic-susceptible. One worrying exception is ST131, a major multidrug resistant ExPEC clone that has spread worldwide since the 2000s. To contain the emergence of this threatening clone, we need to understand what factors favored its emergence and dissemination. Here, we investigated whether multidrug-resistant ST131 had advantageous phenotypic properties beyond multidrug resistance. To this end, we competed the emergent multidrug-resistant ST131 with its antibiotic-susceptible ancestor in different conditions: biofilm production, *in vivo* colonization and virulence experiments. In all *in vivo* competitions, we found that multidrug-resistant ST131 was losing to its ancestor, suggesting a lesser virulence of multidrug-resistant ST131. It was previously described that losing virulence can increase micro-organism persistence in some populations and subsequently its level of transmissibility. Thus, a decreased level of virulence, associated with multidrug resistance, could explain the global success of ST131.

## Introduction

In the last two decades, *Escherichia coli* O25b:H4 of sequence type (ST) 131 has emerged worldwide among human extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) (1, 2). This multidrug resistant clone has become a major public health issue. The evolutionary history of this successful ST has been reconstructed in details. Within O25b:H4 ST131, two clades called B and C were distinguished on the basis of their *fimH* gene allele, *H22* and *H30*, respectively (3, 4). Through a time-calibrated phylogeny, Ben Zakour *et al.* showed that clade B is the ancestor of clade C and that sequential mutational events have shaped the evolution of ST131 from the 1950s (5). This evolutionary scenario shows the diversification of clade B into different subclades (from B1 to B5, then the intermediate B0) and notably clade C. Clade C also diversified into different subclades characterized by the acquisition of the *fimH30* allele around 1980 (subclade C0), followed by the acquisition of the *gyrA-1AB* and *parC-1aAB* alleles encoding fluoroquinolone resistance that occurred around 1987 (subclades C1 and C2). All subclade C2 strains and some of subclade C1 forming C1-M27 cluster (6) are additionally resistant to extended spectrum cephalosporins (ESC) due to the production of extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) of CTX-M type, CTX-M-15 and CTX-M-27, respectively. Epidemiologic studies mostly determined ST131 prevalence among *E. coli* isolates resistant to fluoroquinolones and/or producers of ESBL (7). Studies designed to assess the relative frequencies of clade B and clade C ST131 strains are rare (8–10) and those to assess the relative frequencies of B and C subclades strains do not exist. Recently, Kallonen *et al.* depicted 14.4% of ST131 clades among bacteremia *E. coli* isolates systematically collected between 2001 and 2012 in England (9). Using the English ST131 isolates' whole genome sequences, we were able to assess the relative frequencies of subclades B and C in the present study.

The evolutionary success of ST131 is still largely unexplained. Resistance to antibiotics, notably to fluoroquinolones and ESC may explain the success of clade C strains, as these resistances were shown not to impact the clade C growth fitness (11, 12). However, clones susceptible to antibiotics, such as ST73 and ST95, are as successful as ST131 clade C among bacteremia, suggesting that factors other than antibiotic resistance can participate in the success of a clone (9),

The aim of our study was thus to investigate the potential role of factors other than antibiotic resistance, notably growth rate, biofilm formation, colonization ability and virulence, in the success of ST131 clade C strains. To this purpose, we first established a collection of 39 *E. coli* O25b:H4 ST131 comprising representatives of the ST131 clade and subclade genetic diversity and tested them in a variety of *in vitro* phenotypic tests. We then selected three strains for further *in vitro* and *in vivo* competition assays, including various mouse models.

## **Materials and methods**

Technical details for each section are available in the supplemental material Text S1.

### **Bacterial strains**

The 39 studied O25b:H4 ST131 *E. coli* strains comprised 18 *fimH22* and 21 *fimH30* strains obtained between 1993 and 2012 from different geographic origins and sources (Table S1). Nalidixic acid and ciprofloxacin resistance had been determined by the agar diffusion method and interpreted following the 2015 EUCAST recommendations ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)) and ESBL production by the double disk synergy test (13). CFT073 and *E. coli* K-12 MG1655 strains were used as positive and negative controls, respectively, in the septicemia mouse model.

### **Genome sequencing and analysis**

Whole genome sequencing (WGS) of our 39 strains was performed (Tables S2). All genomes were analyzed for plasmid content and typing [Plasmid Finder, with identity >95%, and

pMLST (14)]. Then, Abricate (15) was used to detect genes encoding antibiotic resistance with Resfinder (16) and virulence factors with a custom virulence database composed of VirulenceFinder (17), the virulence factor database (VFDB) (18), and classical genes characterizing ExPEC. Virotypes were determined as previously described (19). All contigs were submitted to the MicroScope Platform (20) for further gene investigation such as *gyrA/parC* alleles and genes involved in the biofilm formation (21). When necessary, presence or absence of some genes was controlled by PCR.

We investigated how the different subclades B and C of ST131 were represented in our collection and how they evolved in frequency over time in a larger collection from Kallonen *et al.* (9). To that end, we complemented our 39 genomes with 218+21 genomes from two published studies [218 from Kallonen *et al.* (9), 21 from Ben Zakour *et al.* (5)]. The phylogenetic tree including all the strains was constructed from non-recombinant single nucleotide polymorphisms (SNPs) of core genomes using maximum likelihood. To infer the linear trend of Kallonen *et al.*'s isolates over 2001-2012, we fitted a logistic model to the frequency of each subclade as a function of time (in years).

### **Gene deletion and gene complementation**

Replacement by a kanamycin resistance cassette was used to inactivate the chromosomal *fimB* gene of S250 and CES131C strains and the plasmidic *aadA2* gene of CES131C strain following a strategy adapted from Datsenko and Wanner (22). Primers and plasmids used are listed in Tables S3 and S4. Complementation of  $\Delta fimB$  mutants were performed by cloning the promoter and encoding regions of the parental *fimB* genes into pSC-A-amp/kan (Table S4) by using the StrataClone PCR Cloning Kit (Agilent Technologies, Massy, France). The recombinant plasmid was then electroporated into competent strains S250 $\Delta fimB$ :: or CES131C $\Delta fimB$ :: and transformants were selected on lysogeny broth (LB) (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) agar plates containing 100 mg/L of kanamycin. The empty

plasmid pSC-A-amp/kan-Control\_Insert was used as negative control. All mutants were confirmed by PCR and sequencing.

### **Determination of early biofilm formation**

The primary step (5 h incubation) of biofilm formation was measured using BioFilm Ring Test<sup>®</sup> (BioFilm Control, Saint-Beauzire, France) according to the manufacturer's recommendations and as previously described (23). The biofilm formation index (BFI), with values ranging from 20 (absence of biofilm formation) to 0 (high biofilm formation), is inversely proportional to the biofilm formation ability. A BFI value of 10 was chosen as the biofilm production cut-off (biofilm formation:  $BFI \leq 10$ , no biofilm formation:  $BFI > 10$ ). The experiments were repeated at least three times for each strain. BHI broth without any strains was used as negative control, and strains S250 and 39, previously described with this method as strong and never biofilm producers, respectively, as control strains (24).

### **Yeast cell agglutination assay**

Expression of type 1 fimbriae was assessed by using the yeast cell (*Saccharomyces cerevisiae*) agglutination assay as previously described (25), and after adaptations to highlight the early expression of type 1 fimbriae, by using 10  $\mu$ L of a pellet obtained after centrifugation (3000 g, 10 min) of 3 mL of LB broth culture after 2 and 5 h-incubations for the agglutination assay. Based on the biofilm formation and the sequence of the *fim* operon, strains S250 and H1447 were used as positive and negative controls, respectively.

### **Congo red assays**

Curli and cellulose production was assessed by using stationary-phase cultures spotted onto LB low salt (Invitrogen) plates supplemented with 40  $\mu$ g/mL Congo red (Sigma Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) at 30°C during 48 h, as previously described (26). The production of curli fimbriae and cellulose resulted in the red, dry and rough (rdar) colony morphotype.

### **Colicin and/or phage production**

Colicin and/or phage production was detected by plaque lysis assays, with *E. coli* K-12 used as the sensitive strain as previously described (27). The assay was considered as positive when tested strains were surrounded by a halo, corresponding to the growth inhibition of *E. coli* K-12 strain.

### **Fitness assays**

#### Individual fitness assays

Fitness assay was performed as previously described in LB broth (28) by using an automatic spectrophotometer (Tecan Infinite F200 Pro) that measures the OD<sub>600</sub> in each well every 5 min over a period of 24 h. The experiment was repeated three times. Growth curves were then analyzed and maximum growth rates was calculated and expressed in h<sup>-1</sup>.

#### Competition experiments

Selected strains of our collection and constructed mutants were submitted in pairs to competition in different conditions.

#### In vitro planktonic competitions

To determine the relative fitness of strains in planktonic conditions, they were grown in couple in LB broth during 100 generations, *i.e.* during ten days, as previously described (29).

Competitive indexes (CI) were obtained using the following formula:

$\log\text{CFU}[(\text{isolate1}/\text{isolate2})_{T_x}/(\text{isolate1}/\text{isolate2})_{T_0}]$ , isolate1 being the first strain cited and isolate2 the second one in figure legends.

#### In vitro competitions in biofilm conditions

To determine the relative fitness of strains in biofilm conditions, they were grown at 1:1 ratio in mixed colonies during seven days in aerobic and anaerobic conditions, with adaptations to what's previously described (30). For each competition, the experience was repeated three times. CIs were obtained as described above.

#### Intestinal colonization mouse model

Six-week-old female mice CD-1 from Charles River® (L'Arbresle, France) pre-treated with streptomycin before inoculation of challenging strains were used to assess strains' relative ability to colonize the mouse intestine, as previously described (28). At least five mice were used for each competition. At days 1, 4 and 7, the intestinal population of *E. coli* was estimated by plating dilutions of weighed fresh feces on LB agar and LB agar with appropriate antibiotics (kanamycin 50 mg/L or ciprofloxacin 1 mg/L). CIs were obtained as described above.

#### Septicemia mouse model

Female mice OF1 of 14-16 g (4-week-old) from Charles River® were used to assess the strains' relative ability to cause sepsis, as previously described (31). After subcutaneous inoculation of individual strain or mixed strains at a 1:1 ratio, time to death was monitored during seven days. Five to ten mice were used for each assay. In all experiments, CFT073 strain and *E. coli* K-12 MG1655 strain were used as positive and negative control, respectively (32). Kaplan-Meier estimates of mouse survival were performed for individual strain inoculations. In competitions assays, the spleen of all spontaneously dead mice was collected, weighed and pounded in physiological water and infecting population of *E. coli* was estimated by plating dilutions of spleen suspensions on LB agar and LB agar with appropriate antibiotics (kanamycin 50 mg/L, ciprofloxacin 1 mg/L or ampicillin 100 mg/L). CIs were obtained as described above.

#### Urinary tract infection mouse model

CBA female mice of 8-22g (8-week-old) from Janvier® were used to assess strains' relative ability to cause an ascending unobstructed urinary tract infection, as previously developed in our lab (33). Ten mice were used for each competition assay, and the experiments were repeated twice. CIs were obtained as described above.

### **Statistical analysis**

Wilcoxon rank sum test was used to compare the average number of virulence factor (VF) per clade and Fisher's exact test was used to test the distribution of each VF-encoding gene between clades. Individual fitness measurement was estimated by a mixed model with random effect on the strain to take into account the triplicate determination. For biofilm data, two-way repeated measures ANOVA was performed, followed by Tukey's range test when necessary (if there were three groups). The association between groups (virotypes, biofilm phenotypes, yeast agglutination test and Congo red assay) was assessed by Fisher's exact test. For the *in vitro* and *in vivo* competitions, a non-parametric Wilcoxon test on paired data was conducted on CI values, and P values were corrected for multiple comparisons by the Benjamini-Hochberg procedure (34) when necessary. Mouse survival differences were determined by Log-Rank test. A significance level of 0.05 was used for all tests. All statistical analyses were carried out with R software (35).

To visualize all data of our strain collection in one graph, a multiple correspondence analysis (MCA) was realized with R software (35). The variables included in the analysis were strain source, *fimH* allele, fluoroquinolone susceptibility, ESBL production, and biofilm formation phenotype. The distance between the variables and the origin of the graph measures the quality of their representation and is estimated by the square cosine ( $\cos^2$ ): variables far from the origin of the graph are discriminant and got a high  $\cos^2$  and variables close to the origin are not perfectly depicted and got a low  $\cos^2$  (Figure S1A).

### **Ethics statement**

Colonization, septicemia and pyelonephritis murine protocols (n°APAFIS#4948-2016021216251548 v4, n°APAFIS#4951-2016020515004032 v2 and n°APAFIS#4950-2016021211417682 v4, respectively) were approved by the French Ministry of Research and by the ethical committee for animal experiments.



## **Data availability**

Raw sequences of the 39 isolates were deposited in GenBank under BioProject accession number : (ongoing).

## **Results**

### **Evolutionary success of the C1 and C2 subclade strains in extraintestinal infections**

Using both the genome sequences of the ST131 strains published by Kallonen *et al.* (9) and the genome sequences of strains belonging to the different B and C subclades (5), we characterized the B and C subclades of Kallonen *et al.*'s O25b:H4 ST131 strains (Figure S2). By investigating trends in O25b:H4 ST131 subclades frequency over the period 2001-2012 (Figures 1A, 1B, 1C) in extraintestinal infections, we observed that (i) B4 and B5 subclades strains increased more than the other B subclades strains, (ii) clade C strains increased more than clade B strains and (iii) C2 subclades strains displayed the most important increase. Thus, although both clades B and C were maintained over this time period, clade C appears more evolutionarily successful than clade B.

### **Establishment of a collection of representative strains of the ST131 O25b clades and subclades**

#### Clades and subclades

To determine which previously established ST131 clades and subclades our 39 strains belonged to, a phylogenetic tree was inferred using core genomes exempt of recombinant regions (Figure S2). Our collection comprised strains belonging to each subclade B (except for B2 and B0) and each subclade C. Among the 19 clade B strains, 17 displayed the expected *fimH22*, one a *fimH22*-like variant, and one, CES131C strain belonging to subclade B4, the *fimH30* variant that had been described as specific of clade C strains. For these reasons, CES131C strain was called “Hybrid” in the rest of the study.

### Plasmids

All strains but one (strain 208) harbored an IncF plasmid with a FII, FIA and FIB replicon allele composition corresponding to the one previously described for clade B and C1 and C2 subclades strains (12), except that one C1 subclade strain (CES9C) lacked the FIB replicon as described in C2 subclade strains (Table S5).

### Genes encoding antibiotic resistance

As shown in Table S5, our collection comprised strains that displayed a diverse antibiotic resistance-encoding gene content in both clades B and C, with a gradual accumulation of these genes from clade B to clade C.

### VF-encoding genes

Among the genes classically sought for in ExPEC (19), those found in our strains are presented according to subclades in Table S6. The average number of VF-encoding genes was higher in clade B strains ( $17 \pm 2.1$ ) than in clade C strains ( $14.3 \pm 1.3$ ) ( $P < 0.0001$ ). The *hlyF*, *cdtB*, *iroN*, *kpsMII*, *cvaC*, *iss* and *ibeA* genes were significantly more frequent among clade B strains than among clade C strains whereas the opposite was found for the *sat* gene. Virotypes (19) were significantly associated with subclades ( $P < 0.00001$ ) and virotypes not yet described were displayed by Hybrid, one C1 subclade and three C2 subclade strains.

### **Individual strain phenotypic assays *in vitro***

#### Maximum growth rate (MGR)

We assessed the fitness of our 39 strains by measuring MGR in planktonic conditions (Figure 3). MGR did not differ significantly between clade B and clade C strains ( $P = 0.08$ ), and between clinical and feces isolates ( $P = 0.07$ ) (Figures 3A and 3B). Within clade B strains, those resistant to nalidixic acid seemed to have a lower MGR than the susceptible ones (Figure 3C), but this difference was not significant ( $P = 0.2$ ). Regarding clade C strains, no

significant MGR differences were observed between nalidixic acid/ciprofloxacin-resistant strains and susceptible strains ( $P=0.9$ ) (Figure 3D).

#### Kinetic of early biofilm formation and expression of type 1 and curli fimbriae

Clade B strains were more frequently biofilm producers than clade C strains at 2 and 5 h ( $P<0.001$ ). We found three significantly different phenotypes of early biofilm production ( $P<0.0001$ ) within our 39 strains (Figure 2, Table S5): early and persistent producers ( $BFI \leq 10$  at 2, 3 and 5 h), delayed producers ( $BFI > 10$  at 2 and 3 h but  $\leq 10$  at 5 h) and never producers ( $BFI > 10$  at 2, 3 and 5 h). As BFI values after 2 and 3 h of incubation classified a given strain into the same biofilm production phenotype (Figure 2A), only BFI values obtained after 2 and 5 h of incubation were considered for further analyses. The 20 clade C strains were either delayed producers ( $n=8$ ) or never producers ( $n=12$ ). There was no significant association between subclades C and biofilm phenotype. Clade B strains produced biofilm more frequently than clade C strains. Five (71%) of the B5 strains were early producers and two (29%) were delayed producers, whereas all eight B4 strains were delayed or never producers. This difference between B5 and B4 strains was statistically significant ( $P=0.02$ ).

As the ability to form early biofilm is linked to type 1 fimbriae and curli fimbriae expression (36), we studied these expressions in our strains by using the yeast agglutination test and analyzing colony aspect of bacteria spotted on Congo red agar, respectively. After 2 and 5 h of shaking growth, we observed that the early biofilm producers ( $n=8$ ) expressed their type 1 fimbriae more quickly than the delayed and never producers ( $P \leq 0.0001$ ) (Table 1). Applying the standard yeast agglutination test as Totsika *et al.* (25) in which fimbriae expression is assessed after  $\geq 24$  h, no significant differences were observed for type 1 fimbriae expression according to biofilm phenotypes or clade membership, in both shaking and static conditions (Table 1). Production of curli fimbriae and cellulose was explored (Table 2). There was a significant association between Congo red morphotype and early biofilm formation capacity

( $P < 0.0001$ ). Significantly more clade B (47%) than clade C strains (15%) were positive for the Congo red assay ( $P < 0.05$ ).

#### Genes potentially linked to different phenotypes of early biofilm formation

To investigate the genetic factors potentially involved in differences in biofilm formation, we examined the diversity in the *fim* operon across all strains, knowing that Fim proteins participate in biofilm formation (21) and that an insertion sequence ISEc55 has been described in the clade C strain *fimB* gene (25) that encodes a co-factor of the type 1 fimbriae synthesis regulation. We found at least one non-synonymous SNP per gene in the *fim* operon between clade B and clade C strains (Figure S3). The entire *fim* operon was the same in all clade C strains, including ISEc55 within the *fimB* gene. Within clade B, two strains (H1447 and 001-001) found as delayed biofilm producers possessed a partially deleted *fim* operon. Hybrid, which was also a delayed biofilm producer, displayed a *fim* operon completely different from that of the other clade B strains, showing a perfect match with the *fim* operon of clade C strains, except for two SNPs and the absence of ISEc55 within its *fimB* gene (Figure S3). In order to assess the role of the *fimB* gene inactivation in clade C, we constructed  $\Delta$ *fimB* variants from an early biofilm producer B1 strain (S250 strain), and a delayed biofilm producer (Hybrid). Both  $\Delta$ *fimB* variants lost their ability to form biofilm during the 5h-time period (Figures 2B and 2C). Complementation with the wild *fimB* gene restored the biofilm production phenotype displayed by the parental strain of the two variants (Figures 2B and 2C).  $\Delta$ *fimB* variants were also submitted to yeast agglutination test and Congo red assay. Both  $\Delta$ *fimB* variants were negative for early yeast agglutination test, unlike parent strains, but were positive for standard test. No changes were observed on Congo red phenotype for both variants (data not shown).

Further genes and/or deduced proteins previously described as involved in *E. coli* biofilm formation (21) were compared between our strains by taking S250 strain as reference (data

not shown). We observed identical protein sequence modifications in all B4 strains that were all delayed biofilm producers: substitution K142Q in FlgD that is required for flagellar hook assembly (37), the presence of the *nanC* gene (absent in the other clade B strains) and encoding N-acetylneuraminic acid porin of which regulators also control the *fimB* expression (38), and a 7-bp deletion at the end of the *ydaM* gene encoding a diguanylate cyclase playing a role in the curli biosynthesis by inducing the transcription of the regulator CsgD.

### **Strain selection for competition assays**

In order to compare more accurately the fitness of clade B and C strains, we turned to competitions assays. To select candidates for competitions among our 39 strains, we used the phylogenetic history (Figure S2), the multiple correspondence analysis (Figure S1B), acquired antibiotic resistance (Table S5) and MGR values. Among clade B strains, we selected strain S250 *i.e.* one of the two most ancestral strains (subclade B1) that we called “Ancestor”. Among clade C strains, we selected a C1 subclade strain, CES164C, harboring the clade C-characteristic fluoroquinolone resistance and a limited plasmid-mediated resistance (amoxicillin resistance related to TEM enzyme), to avoid the potential burden of additional resistances, such as that related to the production of CTX-M-15 in each C2 subclade strain. Accordingly, we called CES164C strain “Emergent”. We also retained Hybrid (subclade B4) that harbors the first trait having characterized the emergence of clade C strains *i.e.* the *fimH30* allele.

As shown in Table 3, Ancestor, Emergent and Hybrid displayed a similar average MGR in LB (Wilcoxon Rank Test,  $P > 0.1$ ), were non-colicin/phage producers, but displayed differences in early biofilm formation, type 1 fimbriae expression and Congo red phenotype, as well as in the number and content of genes encoding antibiotic resistance and VFs (Table 3 and Figure 4). However, some VF-encoding genes were present only in Ancestor: the invasins-encoding *ibeA* gene, the salmochelin-encoding *iroBCDEN* cluster, and the *etsC* gene encoding a

putative secretion system I, whereas some others were only present in Hybrid: the *afaACDE* and *draP* encoding Afa/Dr adhesins, the *daaF* gene encoding the F1845 fimbrial adhesin, the *celB* gene encoding a major carbohydrate active-transport system and the *mcbA* gene encoding a bacteriocin.

To assess the potential role of the *fimB* gene in the fitness of our strains, we also retained  $\Delta fimB::Kana$  variants of Ancestor and Hybrid, the absence of kanamycin cassette fitness cost having been checked *in vivo* by competing Ancestor $\Delta fimB::Kana$  against Ancestor $\Delta fimB::$  and Hybrid $\Delta fimB::Kana$  against Hybrid $\Delta fimB::$  (see Figures 6 and 8). We also checked the absence of fitness cost of the  $\Delta aada2::Kana$  variant by competing Hybrid $\Delta aada2::Kana$  against Hybrid in planktonic conditions in LB, as we were obliged to use only streptomycin susceptible strains in the intestinal colonization model (data not shown).

## **Competition assays**

### In planktonic conditions

No significant difference was observed between the relative fitness of Ancestor, Emergent and Hybrid in aerobic batch LB growth as CIs did not exceed 1 or -1 log (Figure 5A). The absence of the *fimB* gene did not impact the relative fitness of Ancestor and Hybrid (Figure 5A).

### In mature biofilm conditions

No significant difference was observed between the relative fitness of Ancestor, Emergent and Hybrid in aerobic and anaerobic biofilm growth conditions as CIs did not exceed 1 or -1 log (Figure 5B). However, a small competitive advantage was observed for both Ancestor and Hybrid against Emergent, after 7 days in anaerobic biofilm conditions. Lack of the *fimB* gene did not impact the relative fitness of Ancestor and Hybrid in these conditions (Figure 5B).

### Intestinal colonization mouse model

Ancestor displayed a better intestinal colonization capacity than Emergent. Following the streptomycin treatment, none of the mice used in this experiment had Enterobacteriaceae in feces at the time of tested bacteria inoculation. Feces sampled at each studied time contained between  $10^5$  and  $10^{10}$  *E. coli* per gram showing a satisfactory colonization rate of mice (data not shown). Ancestor outcompeted significantly Emergent after seven days post-inoculation by at least 1.5 log CFU ( $P = 0.02$ ) (Figure 6), whereas there were no significant differences between Ancestor and Hybrid, and Emergent and Hybrid. Lack of the *fimB* gene did not seem to impact the colonization ability of Ancestor and Hybrid (Figure 6).

#### Septicemia mouse model

In terms of *in vivo* virulence expression, Ancestor, Emergent and Hybrid were “killers”, as they killed between 10 and 80% of the mice 24 h after inoculation (39). Kaplan-Meier survival curves showed significantly different killing patterns (Figure 7): Ancestor killed 70% of the mice in 24 h and 100% in 26 h whereas Emergent and Hybrid, that killed 0 and 20% of the mice in 24 h, respectively, required four days to kill 100% of the mice ( $P < 0.001$ ). No significant difference was observed between the positive control CFT073 killing pattern and the Ancestor’s one. The lack of the *fimB* gene in Ancestor and Hybrid did not impact their killing pattern (Figure 7). In order to observe subtler differences in the *in vivo* virulence, competitions in a 1:1 ratio were performed in this mouse model. Spleen bacterial analyses showed that Ancestor outcompeted by 1 and 2 log Hybrid and Emergent, respectively ( $P = 0.002$ ), and Hybrid outcompeted Emergent by 1 log ( $P = 0.002$ ) (Figure 8). Lack of the *fimB* gene in Ancestor and Hybrid did not impact their *in vivo* virulence in this mouse model (Figure 8).

#### Urinary tract infection mouse model

Ancestor displayed a better urinary tract colonization capacity than Emergent. In total, 30

mice were inoculated, with an overall infection rate of 87%, and no death was observed 48 h after the inoculation. Bladders and kidneys collected 48 h after inoculation contained an average of  $9.10^7$  CFU/g (range:  $4.10^4$ - $2.10^9$  CFU/g) and of  $5.10^5$  CFU/g (range:  $6.10^1$ - $2.10^6$  CFU/g), respectively, showing a satisfactory colonization rate of mice (data not shown). Ancestor outcompeted Emergent by about 2 log in the bladder and the kidneys ( $P=0.004$ ) (Figure 9). Hybrid outcompeted Emergent by about 2.5 log in the bladder ( $P=0.008$ ) but not in the kidneys (Figure 8). No significant difference was observed between Ancestor and Hybrid, even though Hybrid was predominant of about 2 log more in average in the kidneys (Figure 9).

## Discussion

The purpose of this work was to examine the phenotypic differences between clade B and clade C strains regarding MGR, early biofilm formation, colonization ability and virulence, in order to estimate their potential role in the success of ST131 clade C strains. To our knowledge, this is the first study that compares ST131 strains from clade B and clade C under competition conditions in various *in vitro* and *in vivo* models.

This study collection comprised representative strains of subclade B and C, except for one, called Hybrid, which belonged to subclade B4 and harbored a *fimH30* allele. This exceptional feature has already been reported in another subclade B4 strain (5), indicating that *fim* operon recombination that shaped the clade C evolution had also occurred among clade B strains, but apparently with a lower adaptive success in the genetic background of clade B than in that of clade C.

No growth rate difference was detected between our clade B and clade C strains and between fluoroquinolone susceptible and resistant strains. The latter finding is consistent with the fact



that, among the mutations leading to fluoroquinolone-resistance, those observed in ST131 displayed the lowest fitness cost (11). Moreover, no growth rate difference was observed between clinical and commensal strains of our collection. This might suggest that ST131 is adapted to both commensalism and extra-intestinal virulence, supporting the idea that virulence could be a derivative of commensalism (29).

In the literature, the genetic and phenotypic variability of ST131 subclades were rarely explored in details. Our analyses of Kallonen *et al.*'s blood *E. coli* isolates showed that C1 and C2 subclade strains increased in frequency over time and that clade B strains, notably those of B4 and B5 subclades, persisted as well, representing 16.5% of the ST131 isolates. One of the most interesting findings of our study was that clade C strains were less virulent and had lower intestinal and urinary colonization capacities than clade B strains. Regarding intestinal colonization, no comparison exists in the literature between these two clades, but contradictory results were obtained considering intestinal cell adhesion capacity (40). In terms of virulence, conflicting results were published, as, in one hand, fluoroquinolone susceptible ST131 strains were shown to kill 50% of the mice when resistant ST131 strains killed 20% (41), and, in another hand, strains of virotype D, *i.e.* clade B-specific virotype, were shown to be less virulent than strains of other virotypes associated with clade C (39). Regarding urinary colonization, a clade C ST131 strain compared with strains belonging to well-known UPEC STs in separate mouse urinary tract infection (UTI) models, was shown to have a higher UTI ability (28). Here, we demonstrated that a representative subclade B1 strain (Ancestor) outcompeted a representative clade C strain (Emergent) in a UTI model. Moreover, the "Hybrid" B4 subclade strain (harboring the *fimH30* allele) outcompeted the clade C strain in the bladder but not in the kidneys. Interestingly, Hybrid strain also displayed intermediate phenotypes with regard to intestine colonization and sepsis in mice, which could illustrate the gradual loss of virulence of ST131 over its phylogenetic evolution.

According to Diard and Hardt (42), a high virulence may decrease the fitness of a strain by compromising its transmission, resulting in its decline in the population. This has been well documented in the classical study of the attenuation of the myxoma virus in Australia (43). The loss of virulence in clade C strains might explain the described higher frequency of clade C strains in asymptomatic bacteriuria than clade B strains (44) and the described capacity of one clade C strain to colonize the mouse urinary tract during a longer time period in comparison with non-ST131 UPECs (28). Therefore, urine might be considered as an additional reservoir of ST131 clade C.

As previously described, our clade B strains were more frequently early biofilm producers than clade C strains (23, 24, 45). Knocking out the *fimB* gene in clade B strains resulted in loss of both early biofilm production capacity and early type 1 fimbriae expression. It was shown that clade C ST131 mutants devoid of type 1 pili expression had a lower intestinal and urinary tract colonization abilities compared to parent strains (25, 40). We subjected  $\Delta$ *fimB* clade B mutants to competition experiments with parent strains. No differences were detected neither during growth in mature biofilm conditions nor during mouse intestinal colonization and septicemia model, suggesting that early biofilm production kinetic doesn't seem to contribute to the better colonization abilities or to the higher virulence observed in clade B strains. In the same way, *E. coli* biofilm formation capacity on abiotic surfaces was not correlated to the ability to durably colonize mouse intestine (29). However, to confirm this hypothesis, competitions between Ancestor  $\Delta$ *fimB* mutant and Emergent seem to be required.

The originality and strength of our study was to analyze phenotypic differences between clade B and clade C ST131 strains and, moreover, under competition conditions. The limited number of strains submitted to *in vivo* competitions can appear as a limitation of our study, but this is in accordance with ethical concerns related to animal experimentations.

Transposition of our *in vivo* results to human has to be made with caution because the used

animal models do not strictly reflect the infection physiological process observed in humans, particularly for the UTI model in which bacteria urethra ascent is absent.

To conclude, our results suggest that loss of virulence could have contributed to the global success of ST131 clade C.

## Acknowledgments

We thank Christophe Beloin for his advices about biofilm exploration. We thank MÉRIL Massot, Marie Vigan and Cedric Laouénan for their help with statistical analyses. We also thank Olivier Tenaillon and Antoine Bridier-Nahmias for genomic analyses assistance. Finally, we thank Johann Beghain, Mélanie Magnan and Françoise Chau for their technical assistance in this work.

This study was supported by a grant from the project JPI-EC-AMR 2016 with the French Agence Nationale de la Recherche (ANR) as sponsor (N°. ANR-16-JPEC-0002-04) to MHNC and by the “Fondation pour la Recherche Médicale” (Equipe FRM 2016, grant number DEQ20161136698) to ED.

## References

1. Price LB, Johnson JR, Aziz M, Clabots C, Johnston B, Tchesnokova V, Nordstrom L, Billig M, Chattopadhyay S, Stegger M, Andersen PS, Pearson T, Riddell K, Rogers P, Scholes D, Kahl B, Keim P, Sokurenko EV. 2013. The epidemic of extended-spectrum- $\beta$ -bactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *mBio* 4:e00377-13.
2. Johnson JR, Tchesnokova V, Johnston B, Clabots C, Roberts PL, Billig M, Riddell K, Rogers P, Qin X, Butler-Wu S, Price LB, Aziz M, Nicolas-Chanoine M-H, Debroy C, Robicsek A, Hansen G, Urban C, Platell J, Trott DJ, Zhanel G, Weissman SJ, Cookson

- BT, Fang FC, Limaye AP, Scholes D, Chattopadhyay S, Hooper DC, Sokurenko EV. 2013. Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 207:919–928.
3. Olesen B, Frimodt-Møller J, Leihof RF, Struve C, Johnston B, Hansen DS, Scheutz F, Krogfelt KA, Kuskowski MA, Clabots C, Johnson JR. 2014. Temporal trends in antimicrobial resistance and virulence-associated traits within the *Escherichia coli* sequence type 131 clonal group and its H30 and H30-Rx subclones, 1968 to 2012. *Antimicrob Agents Chemother* 58:6886–6895.
  4. Petty NK, Ben Zakour NL, Stanton-Cook M, Skippington E, Totsika M, Forde BM, Phan M-D, Gomes Moriel D, Peters KM, Davies M, Rogers BA, Dougan G, Rodriguez-Baño J, Pascual A, Pitout JDD, Upton M, Paterson DL, Walsh TR, Schembri MA, Beatson SA. 2014. Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:5694–5699.
  5. Ben Zakour NL, Alsheikh-Hussain AS, Ashcroft MM, Khanh Nhu NT, Roberts LW, Stanton-Cook M, Schembri MA, Beatson SA. 2016. Sequential acquisition of virulence and fluoroquinolone resistance has shaped the evolution of *Escherichia coli* ST131. *mBio* 7:e00347-00316.
  6. Matsumura Y, Pitout JDD, Gomi R, Matsuda T, Noguchi T, Yamamoto M, Peirano G, DeVinney R, Bradford PA, Motyl MR, Tanaka M, Nagao M, Takakura S, Ichiyama S. 2016. Global *Escherichia coli* sequence type 131 clade with *bla*<sub>CTX-M-27</sub> gene. *Emerg Infect Dis* 22:1900–1907.
  7. Nicolas-Chanoine M-H, Bertrand X, Madec J-Y. 2014. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev* 27:543–574.
  8. Morales-Barroso I, López-Cerero L, Molina J, Bellido M, Navarro MD, Serrano L, González-Galán V, Praena J, Pascual A, Rodríguez-Baño J. 2017. Bacteraemia due to non-ESBL-producing *Escherichia coli* O25b:H4 sequence type 131: insights into risk factors, clinical features and outcomes. *Int J Antimicrob Agents* 49:498–502.
  9. Kallonen T, Brodrick HJ, Harris SR, Corander J, Brown NM, Martin V, Peacock SJ, Parkhill J. 2017. Systematic longitudinal survey of invasive *Escherichia coli* in England

- demonstrates a stable population structure only transiently disturbed by the emergence of ST131. *Genome Res* 27:1437–1449.
10. Blanco J, Mora A, Mamani R, López C, Blanco M, Dahbi G, Herrera A, Blanco JE, Alonso MP, García-Garrote F, Chaves F, Orellana MÁ, Martínez-Martínez L, Calvo J, Prats G, Larrosa MN, González-López JJ, López-Cerero L, Rodríguez-Baño J, Pascual A. 2011. National survey of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain. *J Antimicrob Chemother* 66:2011–2021.
  11. Huseby DL, Pietsch F, Brandis G, Garoff L, Tegehall A, Hughes D. 2017. Mutation supply and relative fitness shape the genotypes of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* 34:1029–1039.
  12. Johnson TJ, Danzeisen JL, Youmans B, Case K, Llop K, Munoz-Aguayo J, Flores-Figueroa C, Aziz M, Stoesser N, Sokurenko E, Price LB, Johnson JR. 2016. Separate F-type plasmids have shaped the evolution of the H30 subclone of *Escherichia coli* sequence type 131. *mSphere* 1:e00121-16.
  13. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. 1988. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 10:867–878.
  14. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Møller Aarestrup F, Hasman H. 2014. *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 58:3895–3903.
  15. Seemann T. 2018. :mag\_right: :pill: Mass screening of contigs for antimicrobial and virulence genes: tseemann/abricate. Perl.
  16. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 67:2640–2644.

17. Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, Aarestrup FM. 2014. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 52:1501–1510.
18. Chen L, Zheng D, Liu B, Yang J, Jin Q. 2016. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on. *Nucleic Acids Res* 44:D694–D697.
19. Dahbi G, Mora A, Mamani R, López C, Alonso MP, Marzoa J, Blanco M, Herrera A, Viso S, García-Garrote F, Tchesnokova V, Billig M, de la Cruz F, de Toro M, González-López JJ, Prats G, Chaves F, Martínez-Martínez L, López-Cerezo L, Denamur E, Blanco J. 2014. Molecular epidemiology and virulence of *Escherichia coli* O16:H5-ST131: comparison with *H30* and *H30-Rx* subclones of O25b:H4-ST131. *Int J Med Microbiol* 304:1247–1257.
20. Vallenet D, Engelen S, Mornico D, Cruveiller S, Fleury L, Lajus A, Rouy Z, Roche D, Salvignol G, Scarpelli C, Médigue C. 2009. MicroScope: a platform for microbial genome annotation and comparative genomics. *Database J Biol Databases Curation* 2009:bap021.
21. Niba ETE, Naka Y, Nagase M, Mori H, Kitakawa M. 2007. A genome-wide approach to identify the genes involved in biofilm formation in *Escherichia coli*. *DNA Res Int J Rapid Publ Rep Genes Genomes* 14:237–246.
22. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6640–6645.
23. Flament-Simon S-C, Duprilot M, Mayer N, García V, Alonso MP, Blanco J, Nicolas-Chanoine M-H. 2019. Association between kinetics of early biofilm formation and clonal lineage in *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 10:1183.
24. Nicolas-Chanoine M-H, Petitjean M, Mora A, Mayer N, Lavigne J-P, Boulet O, Leflon-Guibout V, Blanco J, Hocquet D. 2017. The ST131 *Escherichia coli* H22 subclone from human intestinal microbiota: Comparison of genomic and phenotypic traits with those of the globally successful *H30* subclone. *BMC Microbiol* 17:71.
25. Totsika M, Beatson SA, Sarkar S, Phan M-D, Petty NK, Bachmann N, Szubert M, Sidjabat HE, Paterson DL, Upton M, Schembri MA. 2011. Insights into a multidrug

- resistant *Escherichia coli* pathogen of the globally disseminated ST131 lineage: genome analysis and virulence mechanisms. PLOS ONE 6:e26578.
26. Dudin O, Geiselman J, Ogasawara H, Ishihama A, Lacour S. 2014. Repression of flagellar genes in exponential phase by CsgD and CpxR, two crucial modulators of *Escherichia coli* biofilm formation. J Bacteriol 196:707–715.
  27. Smati M, Clermont O, Bleibtreu A, Fourreau F, David A, Daubié A-S, Hignard C, Loison O, Picard B, Denamur E. 2015. Quantitative analysis of commensal *Escherichia coli* populations reveals host-specific enterotypes at the intra-species level. MicrobiologyOpen 4:604–615.
  28. Vimont S, Boyd A, Bleibtreu A, Bens M, Goujon J-M, Garry L, Clermont O, Denamur E, Arlet G, Vandewalle A. 2012. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone O25b:H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities. PloS One 7:e46547.
  29. Diard M, Garry L, Selva M, Mosser T, Denamur E, Matic I. 2010. Pathogenicity-associated islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* are fitness elements involved in intestinal colonization. J Bacteriol 192:4885–4893.
  30. Saint-Ruf C, Garfa-Traoré M, Collin V, Cordier C, Franceschi C, Matic I. 2014. Massive diversification in aging colonies of *Escherichia coli*. J Bacteriol 196:3059–3073.
  31. Smati M, Magistro G, Adiba S, Wieser A, Picard B, Schubert S, Denamur E. 2017. Strain-specific impact of the high-pathogenicity island on virulence in extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. Int J Med Microbiol IJMM 307:44–56.
  32. Johnson JR, Clermont O, Menard M, Kuskowski MA, Picard B, Denamur E. 2006. Experimental mouse lethality of *Escherichia coli* isolates, in relation to accessory traits, phylogenetic group, and ecological source. J Infect Dis 194:1141–1150.
  33. Labat F, Pradillon O, Garry L, Peuchmaur M, Fantin B, Denamur E. 2005. Mutator phenotype confers advantage in *Escherichia coli* chronic urinary tract infection pathogenesis. FEMS Immunol Med Microbiol 44:317–321.

34. Holm S. 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* 6:65–70.
35. R development core team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org>.
36. Fronzes R, Remaut H, Waksman G. 2008. Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *EMBO J* 27:2271–2280.
37. Ohnishi K, Ohto Y, Aizawa S, Macnab RM, Iino T. 1994. FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 176:2272–2281.
38. Condemine G, Berrier C, Plumbridge J, Ghazi A. 2005. Function and expression of an N-acetylneuraminic acid-inducible outer membrane channel in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187:1959–1965.
39. Mora A, Dahbi G, López C, Mamani R, Marzoa J, Dion S, Picard B, Blanco M, Alonso MP, Denamur E, Blanco J. 2014. Virulence patterns in a murine sepsis model of ST131 *Escherichia coli* clinical isolates belonging to serotypes O25b:H4 and O16:H5 are associated to specific virotypes. *PLoS ONE* 9:e87025.
40. Sarkar S, Hutton ML, Vagenas D, Ruter R, Schüller S, Lyras D, Schembri MA, Totsika M. 2018. Intestinal colonization traits of pandemic multidrug-resistant *Escherichia coli* ST131. *J Infect Dis* 218:979–990.
41. Johnson JR, Porter SB, Zhanel G, Kuskowski MA, Denamur E. 2012. Virulence of *Escherichia coli* clinical isolates in a murine sepsis model in relation to sequence type ST131 status, fluoroquinolone resistance, and virulence genotype. *Infect Immun* 80:1554–1562.
42. Diard M, Hardt W-D. 2017. Evolution of bacterial virulence. *FEMS Microbiol Rev* 41:679–697.
43. Kerr PJ. 2012. Myxomatosis in Australia and Europe: A model for emerging infectious diseases. *Antiviral Res* 93:387–415.



44. Liu CM, Stegger M, Aziz M, Johnson TJ, Waits K, Nordstrom L, Gauld L, Weaver B, Rolland D, Statham S, Horwinski J, Sariya S, Davis GS, Sokurenko E, Keim P, Johnson JR, Price LB. 2018. *Escherichia coli* ST131-H22 as a foodborne uropathogen. *mBio* 9:e00470–18, /mbio/9/4/mBio.00470–18.atom.
45. Pantel A, Dunyach-Remy C, Essebe CN, Mesureur J, Sotto A, Pagès J-M, Nicolas-Chanoine M-H, Lavigne J-P. 2016. Modulation of membrane influx and efflux in *Escherichia coli* sequence type 131 has an impact on bacterial motility, biofilm formation, and virulence in a *Caenorhabditis elegans* model. *Antimicrob Agents Chemother* 60:2901–2911.

## Figure legend

**Figure 14. Dynamics of subclades of O25b:H4 ST131 *E. coli* isolated from bacteremia over a 11-year sampling period [data from Kallonen *et al* (9)].** A. Cumulated frequencies of ST131 subclades as a function of time, from the most ancestral subclade B1 at the bottom to the derived subclade C2 on top. B. Frequency of ST131 subclades as a function of time. Subclades are represented by colors. C. Inferred linear trends of ST131 subclade frequencies (among all *E. coli* strains) as a function of time over 2001-2012.

**Figure 2. Early biofilm production.** Biofilm Ring Test<sup>®</sup> was used to measure biofilm formation after 2, 3 and 5h of static incubation. BFI values are inversely proportional to the biofilm formation capacity. A. Biofilm formation for the 39 *E. coli* ST131 strains. Clade B: continuous line; clade C: dashed line. Biofilm groups: blue lines: never producers; green lines: delayed producers; orange lines: early producers. B and C. Biofilm measurements for the *fimB* gene knockout experiments on Ancestor and Hybrid strains, respectively.  $\Delta fimB$ :  $\Delta fimB::$ ;  $\Delta fimBp$ :  $\Delta fimB::pSC-A$ , strain complemented with an empty plasmid;  $\Delta fimBc$ :  $\Delta fimB::pSC-A-fimB$ , strain complemented with its *fimB* gene.

**Figure 3. Maximum growth rate of the 39 *E. coli* strains in LB.** Maximum growth rate is calculated from three independent culture assays and expressed in  $h^{-1}$ . Boxplots indicate

maximum growth rate distribution across strains, and horizontal black bars indicate median values. The upper and lower ends of the box correspond to the upper and lower quartiles, respectively. Error bars represent the standard error of the mean of three experiments. Outliers are represented by dots. Strains were grouped into two categories: A. Clade B and clade C strains; B. Clinical and commensal (feces) strains; C. Nalidixic acid-resistant (R) and susceptible (S) strains within clade B; D. Nalidixic acid-resistant (R) and susceptible (S) strains within clade C. No significant difference was observed in each comparison (Wilcoxon test)

**Figure 4. Virulence factors (VF)-encoding genes in Ancestor, Emergent and Hybrid.**

Each strain is represented by a circle, VF encoding genes specific of a strain are indicated in the unshared part of the circle, while genes in common are indicated in the intersecting region between the two or three involved strains. Among the 67 genes found at least once in these three strains, the 42 common genes are as follows: *fdeC*, *fimACDEFGHI*, *yfcV*, *yagVWXYZ*, *ykgK*, *chuA*, *fyuA*, *entABCEFS*, *fepABCDG*, *fes*, *irp2*, *kpsDEMMTII*, *K5*, *iss*, *malX*, *usp*, *ompT*, *ompA*, *aslA*.

**Figure 5. *In vitro* competitions.** Dots shapes indicate the couple of strains in competition in panels A and B. Competitive index (CI) is expressed in log, and CI above zero (blue line) means that isolate 1 outcompetes isolate 2, and conversely. An interval of  $\pm 1$  log was considered as the limit of discrimination. Error bars represent the standard error of the mean of a least three experiments. A. Competitions at an initial ratio of 1:1 in planktonic conditions in LB medium during 100 generations. B. Competitions at an initial ratio of 1:1 in mature biofilm conditions (bacteria spotted on BHI agar plate) during 7 days, in aerobic (continuous line) and anaerobic atmosphere (dashed line).

**Figure 6. Competition in an intestinal colonization mouse model.** Competitive index (CI) is expressed in log, and CI above zero means that isolate 1 outcompetes isolate 2, and

conversely. An interval of  $\pm 1$  log was considered as the limit of discrimination. Each dot represents a mouse at given times: light blue: day 1, dark blue: day 4 and green: day 7 post-inoculation. Black diamonds depict mean values of CI. Kanamycin resistance cassette: control competition evaluating the cost of the Kanamycin resistance cassette, with Ancestor $\Delta fimB::$  or Hybrid $\Delta fimB::$  as isolate 1, and Ancestor $\Delta fimB::Kana$  or Hybrid $\Delta fimB::Kana$  as isolate 2, respectively. \*  $P=0.02$ , generated by the Wilcoxon signed-rank test and corrected for multiple comparisons by the Benjamini-Hochberg procedure.

**Figure 7. Kaplan-Meier survival curves of mice injected with *E. coli* ST131 strains.**

Strains are represented by line types.

**Figure 8. Competition in septicemia mouse model determined by spleen bacterial load.**

Competitive index (CI) is expressed in log, and CI above zero means that isolate 1 outcompetes isolate 2, and conversely. An interval of  $\pm 1$  log was considered as the limit of discrimination. Kanamycin resistance cassette: control competition evaluating the cost of the Kanamycin resistance cassette, with Ancestor $\Delta fimB::$  or Hybrid $\Delta fimB::$  as isolate 1, and Ancestor $\Delta fimB::Kana$  or Hybrid $\Delta fimB::Kana$  as isolate 2 respectively. \*\*  $P=0.002$ , generated by the Wilcoxon signed-rank test.

**Figure 9. Competition in urinary tract infection mouse model determined by bladder and kidney bacterial load.**

Competitive index (CI) is expressed in log, and CI above zero means that isolate 1 outcompetes isolate 2, and conversely. An interval of  $\pm 1$  log was considered as the limit of discrimination. \*\*  $P<0.01$ , generated by the Wilcoxon signed-rank test and corrected for multiple comparisons by the Benjamini-Hochberg procedure.

**Table 1. Yeast agglutination test applied to the 39 strains in different growth conditions and at different time points according to biofilm production phenotype and clade type.**

Number (%) of strains positive for the yeast agglutination test						
Group	Early test		Standard <sup>a</sup> test			
	Shaking culture		Shaking culture	Static subculture		
	2h	5h		24h	48h	72h
Biofilm ++ (n=8)	8 (100)	8 (100)	8 (100)	8 (100)	8 (100)	8 (100)
Biofilm -+ (n=16)	4 (25) ]*	6 (38) ]*	14 (89)	14 (89)	14 (89)	14 (89)
Biofilm -- (n=15)	1 (7)	1 (7)	13 (87)	14 (93)	15(100)	15(100)
Clade B (n=19)	13 (68) ]*	15 (79) ]*	17 (90)	17 (90)	17 (90)	17 (90)
Clade C (n=20)	0	0	18 (90)	19 (95)	20 (100)	20 (100)

<sup>a</sup>: Standard test was realized according to Totsika *et al.* <sup>41</sup>; ++: early biofilm producer; -+: delayed biofilm producer; --: never biofilm producer; \* Fisher exact test  $P \leq 0.0001$ .

**Table 2. Colony color and morphotype on Congo red agar plates of the 39 strains according to biofilm production phenotype and clade type**

Number (%) of strains with a positive Congor red test		
Group	Congo red staining	Rdar morphotype
Biofilm ++ (n=8)	8 (100)	8 (100)
Biofilm -+ (n=16)	1 (6)	1 (6)
Biofilm -- (n=15)	4 (27)	3 (20)
Clade B (n=19)	9 (47)	9 (47)
Clade C (n=20)	3 (15)	2 (10)

++: early biofilm producer; -+: delayed biofilm producer; --: never biofilm producer; Rdar : red, dry and rough colonies; \* Fisher exact test P<0.0001;

\*\* Fisher exact test P<0.001

**Table 3. Comparative characteristics of the three strains selected for competition assays**

Selected strain	MGR (h <sup>-1</sup> )	Colicin/phage production	Biofilm formation phenotype	Type 1 fimbriae expression	Congo red assay phenotype	Antibiotic resistance encoding gene	Nb of VF encoding genes	Nb of ExPEC VF encoding genes
<b>Ancestor (S250)</b>	1.35±0,06	no	early	in 2h	rdar	/	53	14
<b>Emergent (CES164C)</b>	1.48±0,06	no	never	in 24h	red staining	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>gyrA1AB</i> , <i>parC1aAB</i>	52	14
<b>Hybrid (CES131C)</b>	1.47±0,09	no	delayed	in 2h	white staining	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>aac(3)-IIId</i> , <i>aadA2</i> , <i>mphA</i> , <i>sull</i> , <i>tetA</i> , <i>dfrA12</i>	63	16

rdar: red, dry and rough; VF: virulence factor

## Supplemental material legend

**Text S1. Technical details of the Materials and Methods section**

**Table S1. Strain collection: characteristics known at collection time**

**Table S2. Genome sequence quality**

**Table S3. Primers used in this study**

**Table S4. Plasmids used in this study**

**Table S5. Genotypic and phenotypic analyses of strain collection**

**Table S6. Main virulence factor (VF)-encoding genes**

**Figure S1. Multiple correspondence analyses (MCA) of the 39 *E. coli* ST131 strains. (A)**

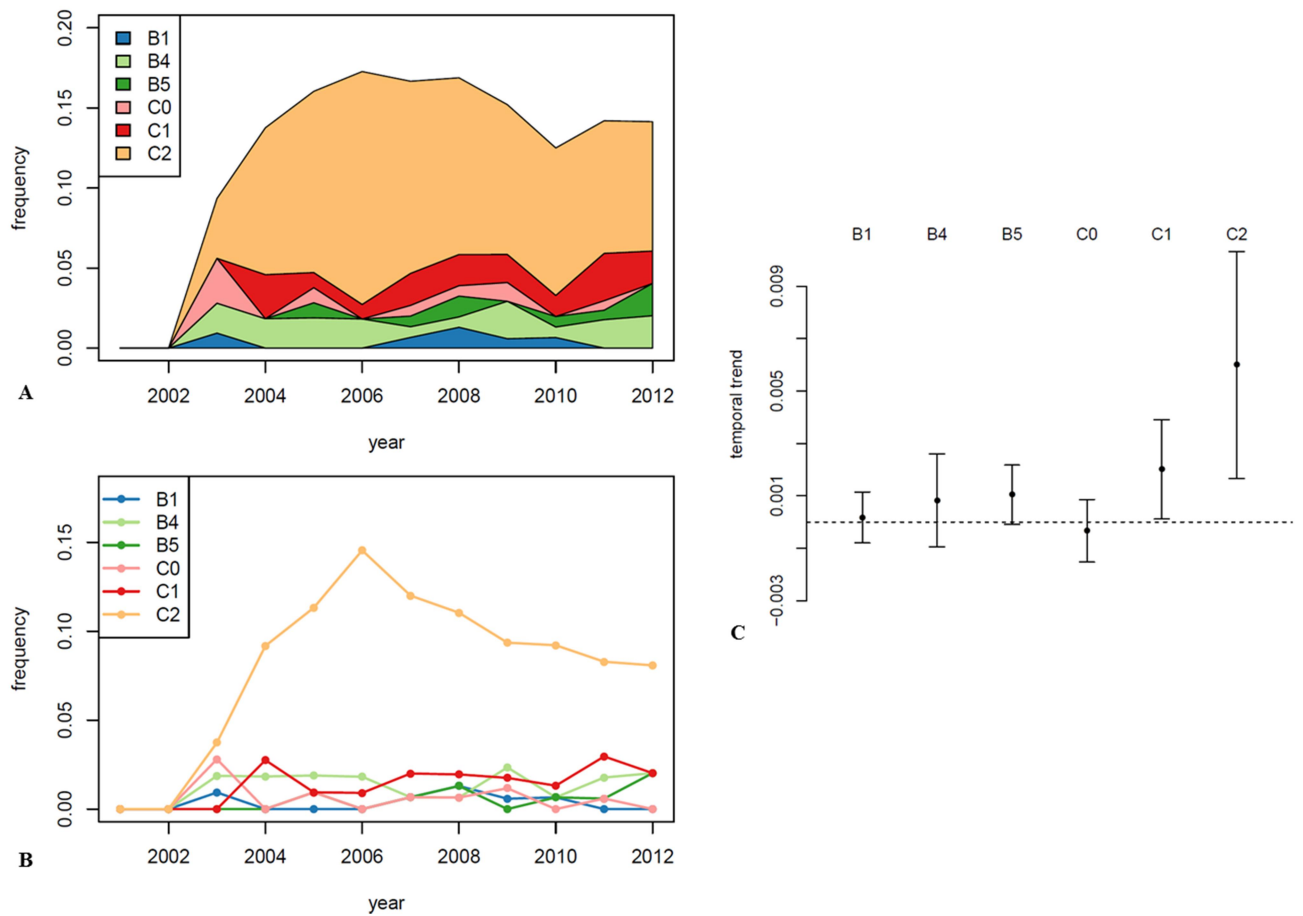
The variables are as follows: the sources (fecal or clinical sample), the *fimH* allele (*H22* or *H30*), fluoroquinolone (FQ) susceptibility (FQ\_S: susceptible to FQ or FQ\_R: resistant to FQ), the ESBL production (ESBL\_P: ESBL producer or ESBL\_N: non-ESBL producer), the biofilm production (early, delayed or never). cos2: square cosine (B) Plane projections on the Dim1-Dim2 of the variables and the strains. Strains or groups of strains are represented by colored circles: clade B in red and clade C in blue; circle size varies with the number of strain represented; variables are represented by black triangles. Locations of the three chosen strains, Ancestor, Hybrid and Emergent are pointed.

**Figure S2. Maximum likelihood phylogenetic tree.** This tree was built from non-recombinant SNPs using maximum likelihood, rooted on a clade A ST131 reference strain, SE15. Scale bar represents the average nucleotide substitutions per site. Branches are colored in accordance with subclades: B1 in yellow, B2 in pale orange, B3 in dark orange, B4 in red, B5 in pink, B0 in purple, C0 in pale blue, C1 in light green, C1-M27 in dark blue and C2 in dark green. Strains are named according to their origin : BZ for Ben Zakour *et al.*<sup>78</sup>, K for Kallonen *et al.*<sup>133</sup> and D for this work.

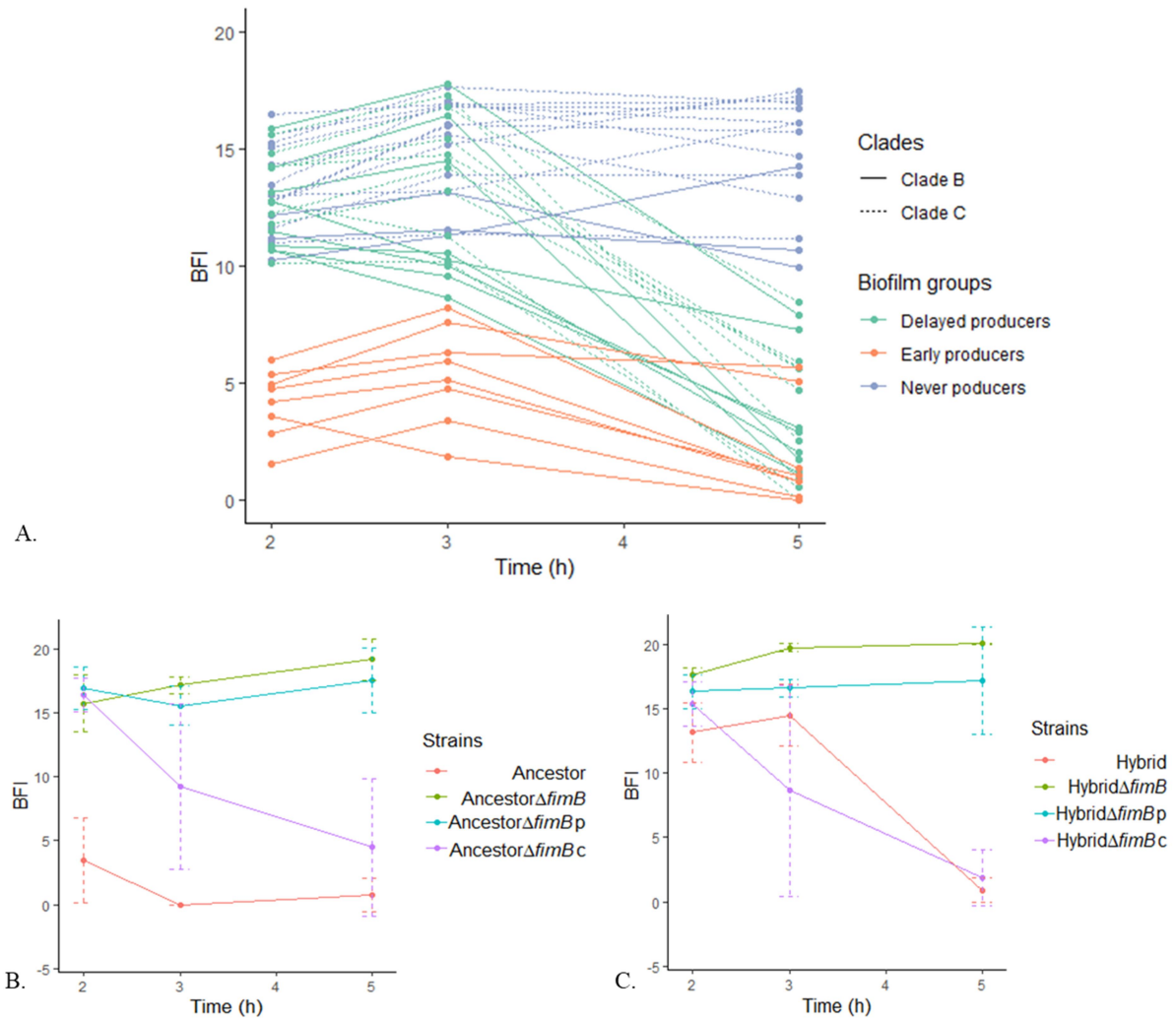
**Figure S3. Schematic representation of the *fim* operon in a clade B strain, a clade C strains and Hybrid strain of subclade B4.** Genes are depicted by arrows except for *fimS* that is an invertible element, and the dotted lines represent ISEc55: the insertion sequence present within the *fimB* gene of all clade C strains. A. Comparison between a representative clade B strain and Hybrid . B. Comparison between Hybrid and a representative clade C strain. SNP: single nucleotide polymorphisms and their effect: non-synonymous and synonymous. The additional number indicates the presence of gap.



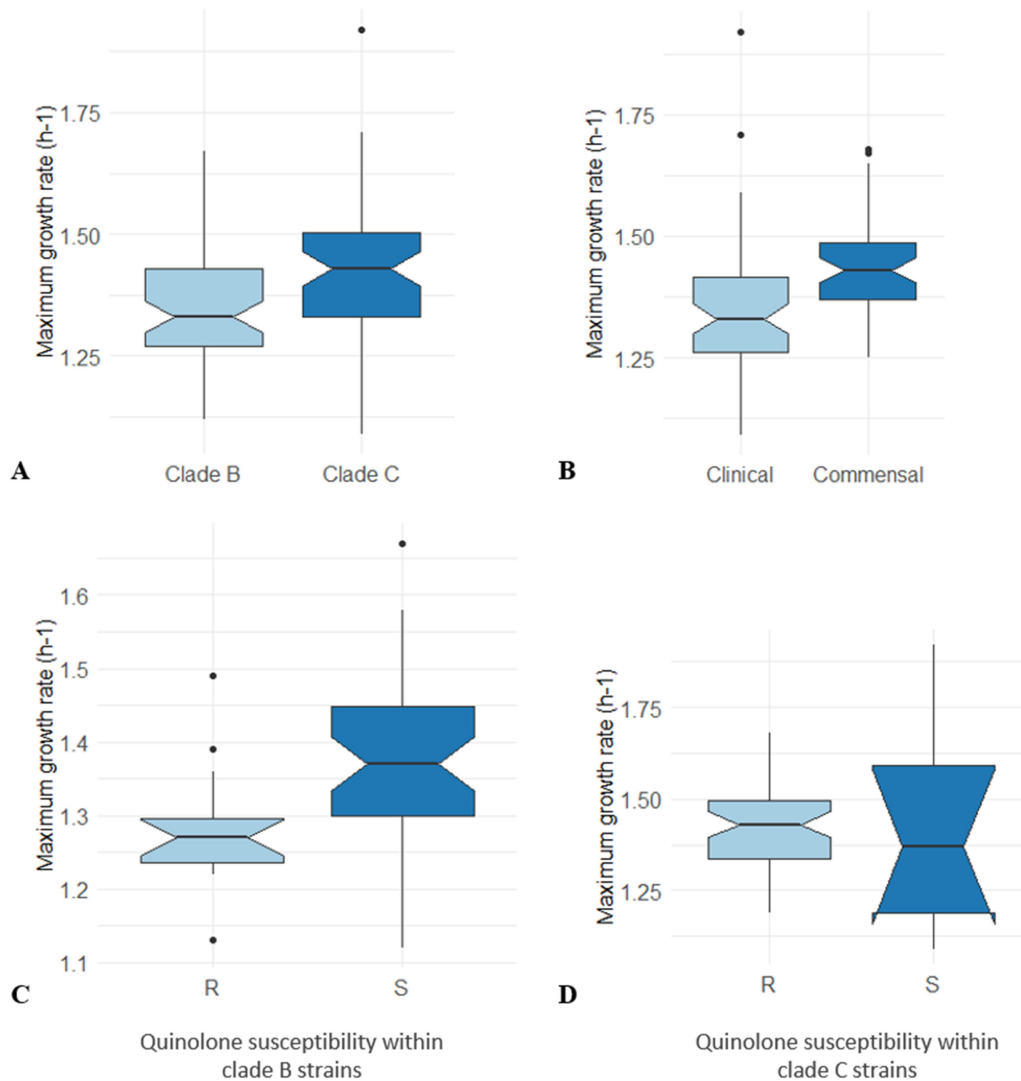
## Figures



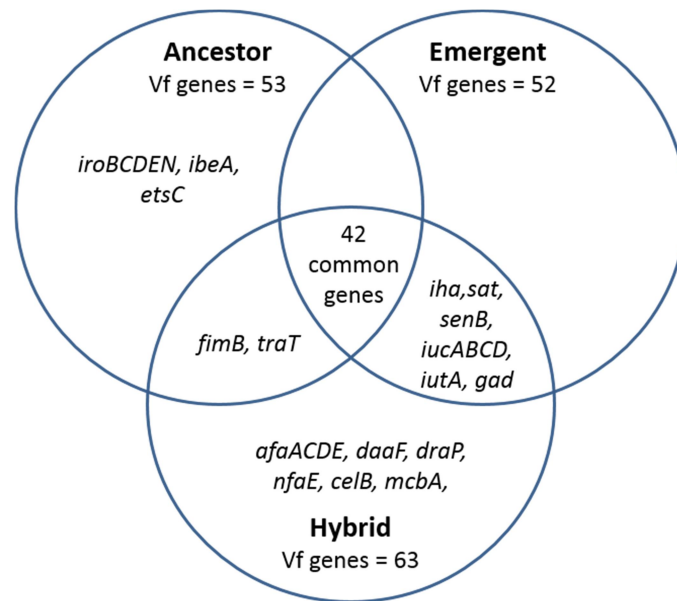
**Figure 15. Dynamics of subclades of O25b:H4 ST131 *E. coli* isolated from bacteremia over a 11-year sampling period [data from Kallonen *et al* (9)].** A. Cumulated frequencies of ST131 subclades as a function of time, from the most ancestral subclade B1 at the bottom to the derived subclade C2 on top. B. Frequency of ST131 subclades as a function of time. Subclades are represented by colors. C. Inferred linear trends of ST131 subclade frequencies (among all *E. coli* strains) as a function of time over 2001-2012.



**Figure 2. Early biofilm production.** Biofilm Ring Test<sup>®</sup> was used to measure biofilm formation after 2, 3 and 5 h of static incubation. BFI values are inversely proportional to the biofilm formation capacity. A. Biofilm formation for the 39 *E. coli* ST131 strains. Clade B: continuous line; clade C: dashed line. Biofilm groups: blue lines: never producers; green lines: delayed producers; orange lines: early producers. B and C. Biofilm measurements for the *fimB* gene knockout experiments on Ancestor and Hybrid strains, respectively.  $\Delta$ *fimB*:  $\Delta$ *fimB*::;  $\Delta$ *fimB*p:  $\Delta$ *fimB*::pSC-A, strain complemented with an empty plasmid;  $\Delta$ *fimB*c:  $\Delta$ *fimB*::pSC-A-*fimB*, strain complemented with its wild type *fimB* gene.

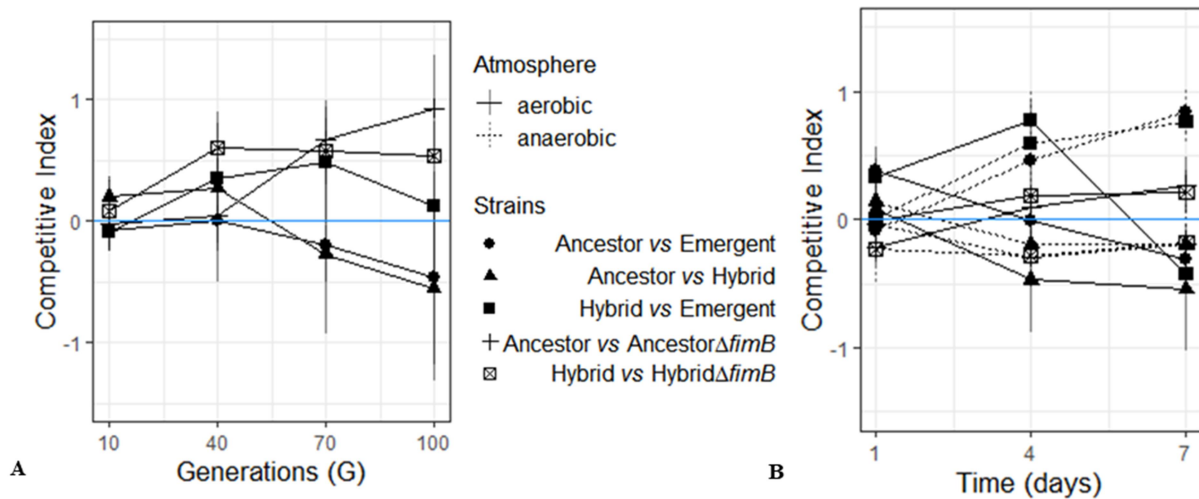


**Figure 3. Maximum growth rate of the 39 *E. coli* strains in LB.** Maximum growth rate is calculated from three independent culture assays and expressed in h<sup>-1</sup>. Boxplots indicate maximum growth rate distribution across strains, and horizontal black bars indicate median values. The upper and lower ends of the box correspond to the upper and lower quartiles, respectively. Error bars represent the standard error of the mean of three experiments. Outliers are represented by dots. Strains were grouped into two categories: A. Clade B and clade C strains; B. Clinical and commensal (feces) strains; C. Nalidixic acid-resistant (R) and susceptible (S) strains within clade B; D. Nalidixic acid-resistant (R) and susceptible (S) strains within clade C. No significant difference was observed in each comparison (Wilcoxon test)

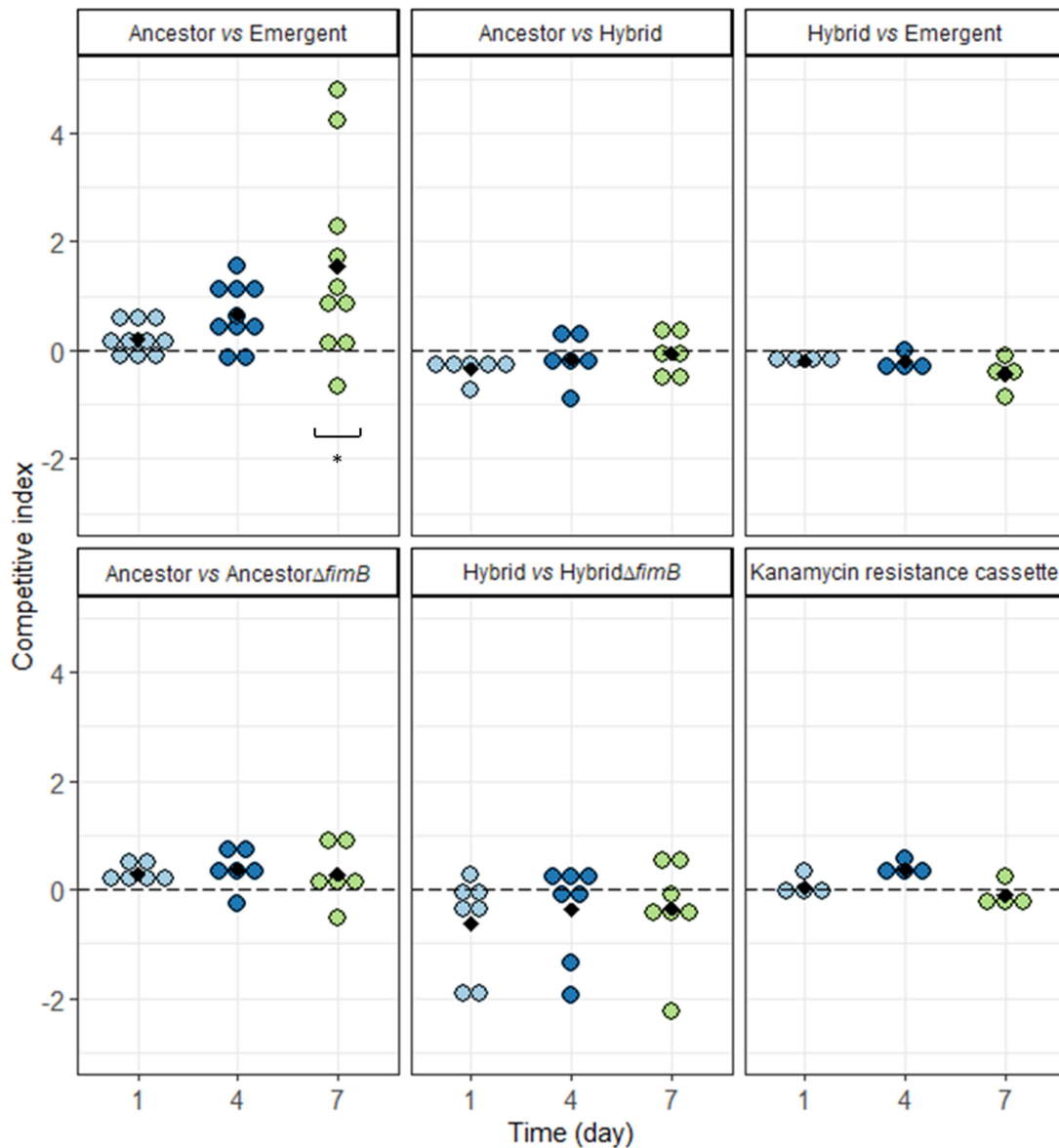


**Figure 4. Virulence factors (VF)-encoding genes in Ancestor, Emergent and Hybrid.**

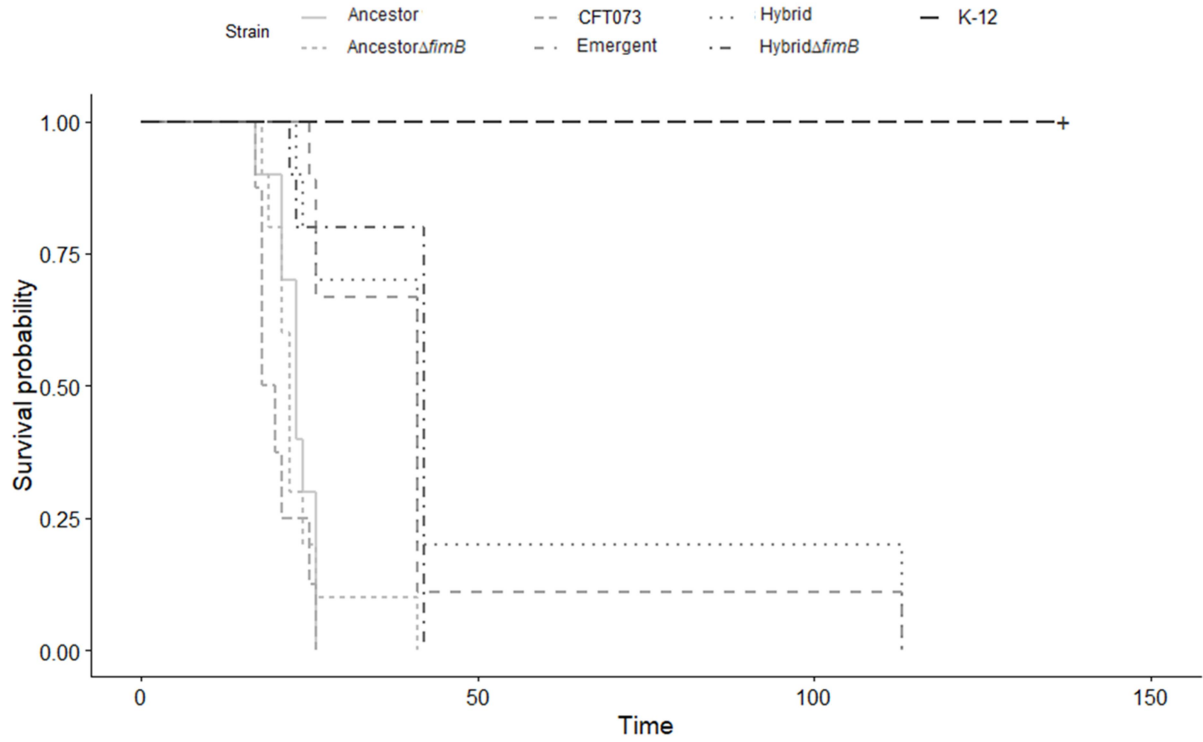
Each strain is represented by a circle, VF encoding genes specific of a strain are indicated in the unshared part of the circle, while genes in common are indicated in the intersecting region between the two or three involved strains. Among the 67 genes found at least once in these three strains, the 42 common genes are as follows: *fdeC, fimACDEFGHI, yfcV, yagVWXYZ, ykgK, chuA, fyuA, entABCEFS, fepABCDG, fes, irp2, kpsDEMNTII, K5, iss, malX, usp, ompT, ompA, aslA*.



**Figure 5. In vitro competitions.** Dots shapes indicate the couple of strains in competition in panels A and B. Competitive index (CI) is expressed in log, and CI above zero (blue line) means that isolate 1 outcompetes isolate 2, and conversely. An interval of  $\pm 1$  log was considered as the limit of discrimination. Error bars represent the standard error of the mean of a least three experiments. A. Competitions at an initial ratio of 1:1 in planktonic conditions in LB medium during 100 generations. B. Competitions at an initial ratio of 1:1 in biofilm conditions (bacteria spotted on BHI agar plate) during 7 days, in aerobic (continuous line) and anaerobic atmosphere (dashed line).

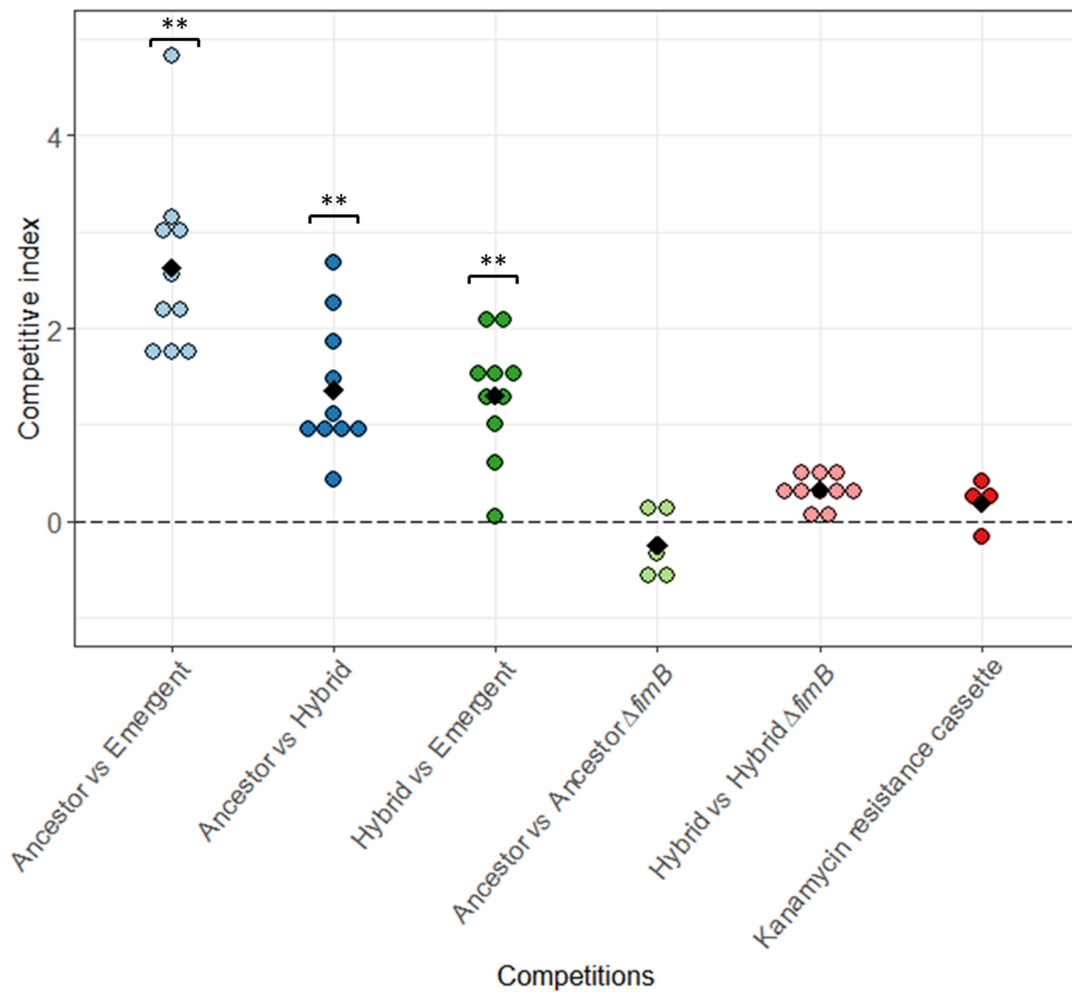


**Figure 6. Competition in an intestinal colonization mouse model.** Competitive index (CI) is expressed in log, and CI above zero means that isolate 1 outcompetes isolate 2, and conversely. An interval of  $\pm 1$  log was considered as the limit of discrimination. Each dot represents a mouse at given times: light blue: day 1, dark blue: day 4 and green: day 7 post-inoculation. Black diamonds depict mean values of CI. Kanamycin resistance cassette: control competition evaluating the cost of the Kanamycin resistance cassette, with *Ancestor* $\Delta$ *fimB*:: or *Hybrid* $\Delta$ *fimB*:: as isolate 1, and *Ancestor* $\Delta$ *fimB*::Kana or *Hybrid* $\Delta$ *fimB*::Kana as isolate 2, respectively. \* P=0.02, generated by the Wilcoxon signed-rank test and corrected for multiple comparisons by the Benjamini-Hochberg procedure.



**Figure 7. Kaplan-Meier survival curves of mice injected with *E. coli* ST131 strains.**

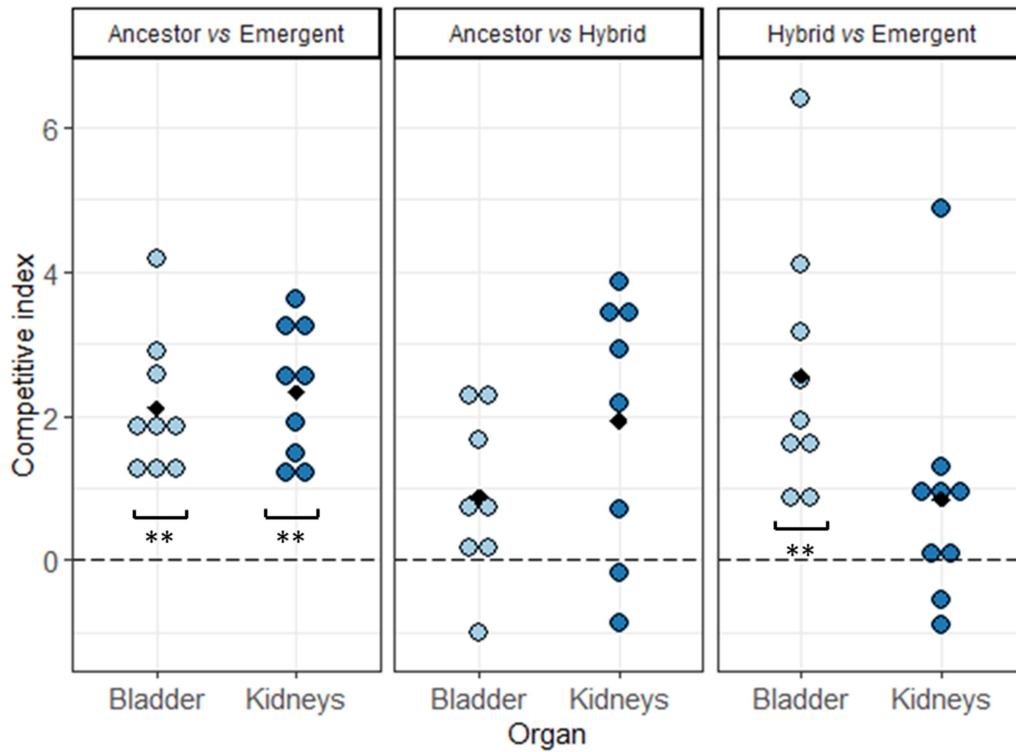
Strains are represented by line types.



**Figure 8. Competition in septicemia mouse model determined by spleen bacterial load.**

Competitive index (CI) is expressed in log, and CI above zero means that isolate 1 outcompetes isolate 2, and conversely. An interval of  $\pm 1$  log was considered as the limit of discrimination. Kanamycin resistance cassette: control competition evaluating the cost of the Kanamycin resistance cassette, with Ancestor $\Delta fimB::$  or Hybrid $\Delta fimB::$  as isolate 1, and Ancestor $\Delta fimB::$ Kana or Hybrid $\Delta fimB::$ Kana as isolate 2 respectively. \*\* P=0.002, generated by the Wilcoxon signed-rank test.





**Figure 9. Competition in urinary tract infection mouse model determined by bladder and kidneys bacterial load.** Competitive index (CI) is expressed in log, and CI above zero means that isolate 1 outcompetes isolate 2, and conversely. An interval of  $\pm 1$  log was considered as the limit of discrimination. \*\*  $P < 0.01$ , generated by the Wilcoxon signed-rank test and corrected for multiple comparisons by the Benjamini-Hochberg procedure.

## Supplementary material

### Text S1

#### Bacterial strains

The *H22* strains, isolated between 1993 and 2011 in Spain (n=7) and Ile de France (n=11), were bacteremia (n=11) and fecal (n=7) strains. Four of these strains were resistant to nalidixic acid and three extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producers. The *H30* strains, isolated between 2001 and 2012 in Spain (n=3) and in Ile de France (n=18), were bacteremia (n=9), urinary tract (n=1) and fecal (n=11) strains. Seventeen of these strains were resistant to nalidixic acid and six ESBL producers. The 39 strains were stored in 20% glycerol at -80°C until use.

#### Genome sequencing and analysis

Whole genome sequencing (WGS) of the 39 strains was performed. Total DNA was extracted using NucleoMag Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Libraries were prepared using Nextera technology and sequenced with an Illumina HiSeq (IntegraGen Genomics, Evry, France) using a 2x100 base pair (bp) paired-end strategy. Reads were assembled with SPAdes (1). We investigated how the different subclades B and C of ST131 was represented in our collection and how they evolved in frequency over time in a larger collection from Kallonen *et al.* (2). To that end, we complemented our 39 genomes with 218+21 genomes from two published studies (218 from Kallonen *et al.* (2), 21 from Ben Zakour *et al.* (3)). We annotated the genomes using Prokka (4), identified the core genome using Roary(5), and inferred the phylogenetic history of all these strains after removing the identified recombinations using Gubbins (6) and the phylogenetic software RAxML (7). Outlier sequences were removed. The tree was then viewed and modified using iTOL (8). From this phylogeny, we identified

sequences belonging to different subclades B0-B5 and C0-C2 of O25b:H4 ST131, as defined in Ben Zakour *et al.* (3).

### **Gene deletion and gene complementation**

Replacement by a kanamycin resistance cassette was used to inactivate the chromosomal *fimB* gene of S250 and CES131C strains and the plasmidic *aadA2* gene encoding streptomycin resistance following a strategy adapted from Datsenko and Wanner (9). Primers and plasmids used are listed in Table S3 and S4. Briefly, the kanamycin resistance cassette was amplified from pKD4 using primers containing 50-79 nucleotide flanking regions complementary to the beginning and end of *fimB* or *aadA2* genes. The knock-out (KO) PCR product was introduced by electroporation into competent cells transformed with a tetracycline or chloramphenicol resistant pKOBEG plasmid carrying the  $\lambda$ -Red recombinase. Then, the kanamycin-encoding gene was eliminated from  $\Delta$ *fimB* or  $\Delta$ *aadA2* mutants as previously described (9).

### **Determination of early biofilm formation**

The primary step of biofilm formation was measured using BioFilm Ring Test<sup>®</sup> (BioFilm Control, Saint-Beauzire, France) according to the manufacturer's recommendations and as previously described (10). Briefly, each strain was sub-cultured twice on brain heart infusion (BHI) agar (Benton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France) at 37°C for 24 h. Three colonies of the second subculture were suspended in BHI broth (BHI broth, Biofilm Control) and density at 600 nm (OD600) was measured (Ultraspex10: Biochrom, Cambridge, UK). An adequate volume of this suspension was then added to a mixture (1% vol/vol) of BHI broth and magnetic microbeads (TONER 4, Biofilm Control) to obtain a final concentration of approximately 10<sup>6</sup> CFU/ml. 200  $\mu$ l of this mix were deposited twice in three polystyrene 96-well microtiter plates that were incubated during 2, 3 and 5 h, respectively. At the end of each incubation time, 100  $\mu$ l of liquid contrast solution (LIC001, Biofilm Control) was added on the top of each well and the microplate was put on a magnetic block for 1 min. This magnet

support is made up of 96 minimagnets centered under the bottom of each well. During magnet contact, free beads were attracted toward the center of the wells, forming a brown spot, while beads embedded in biofilm were blocked and remained undetectable. The microplate was then scanned using a BioFilm Control plate reader. The intensity of the spot was analyzed using the BioFilm Ring Test® software version 3.0.3 and expressed as the biofilm formation index (BFI), with values ranging from 20 (absence of biofilm formation) to 0 (high biofilm formation), inversely proportional to the biofilm formation ability.

### **Yeast cell agglutination assay**

Expression of type 1 fimbriae was assessed by using the yeast cell (*Saccharomyces cerevisiae*) agglutination assay as previously described (11), and after adaptations to highlight the early expression of type 1 fimbriae (after 2 and 5 h of incubation). Briefly, 10 µL of a LB broth suspension of bacterial cells grown for 24 h under stirring were mixed with 10 µL of yeast cells diluted to 5% in phosphate buffer saline (PBS) on a glass slide. Bacterial-yeast aggregation was macroscopically observed; a bacterial strain was considered negative for type 1 fimbriae production when no aggregation appeared after 3 min. Based on the biofilm formation and the sequence of the *fim* operon, strains Ancestor and H1447 were used as positive and negative controls, respectively. To study the early expression of type 1 fimbriae, the same protocol was applied after shorter incubation times, *i.e.* 2 and 5 h, using 10 µL of the pellet obtained after centrifugation (3000g, 10 min) of 3 mL of LB broth culture. When the agglutination test was negative at 24 h, a LB broth suspension of fresh colonies was statically incubated for 24 h. If bacterial-yeast aggregation was still negative at 24 h under these conditions, static cultures were then passaged in one or two further rounds of static incubation, in order to induce type 1 fimbriae expression (11), and agglutination was performed as initially described.

### **Individual fitness assays**

Fitness assay was performed as previously described in LB broth (12). Strains were grown overnight (O/N) in LB broth (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) at 37°C under continuous stirring at 200 rpm. O/N cultures were washed three times in a physiological saline solution, and, after optical density (OD) adjustment, were inoculated twice at 1/10000 in a Costar<sup>®</sup> 96 flat-bottomed well plate. The plate was incubated in an automatic spectrophotometer (Tecan Infinite F200 Pro) that measures the OD<sub>600</sub> in each well every 5 min over a period of 24 h. The experiment was repeated three times. Growth curves were then analyzed and maximum growth rates was calculated and expressed in h<sup>-1</sup>. We decided to explore only the maximum growth rate, because contrary to the lag time (*i.e.* time required to reach the exponential growth phase) and the final optical density, the maximum growth rate does not depend on the initial number of bacteria and on the well position, and is less affected by the form of the growth curve (13).

### **Competitions experiments**

Three strains of our collection were selected to perform competition assays (Figure S1B): S250 called here Ancestor (*H22*, clade B), CES164C called here Emergent (*H30*, clade C) and CES131C called here Hybrid (*H30*, clade B), as well as two constructed mutants: Ancestor $\Delta$ *fimB*::Kan and Hybrid $\Delta$ *fimB*::Kan. To be homogenous with the intestinal colonization experiment, in which all used strains needed to be equally susceptible to streptomycin, the mutant Hybrid $\Delta$ *aadA2*::Kan was used in the *in vitro* competitions against Ancestor and Emergent.

### *In vitro* planktonic competitions

To determine the relative fitness of strains in planktonic conditions, they were grown in couple in LB broth during 100 generations as previously described (14). Briefly, O/N cultures were diluted thousand-fold in LB at a final ratio of 1:1. Every 24 h, 10 generations of bacteria were produced, and cultures were diluted a thousand-fold in fresh medium during 10 days.

The relative amount of each strain was determined after plating dilutions on LB agar and LB agar with appropriate antibiotics (kanamycin 50 mg/L or ciprofloxacin 1 mg/L). To assess the potential role of the *fimB* gene, competitions between Ancestor, Hybrid and their respective  $\Delta fimB::Kan$  mutants were also carried out. Neutrality of the kanamycin resistance cassette was estimated by using competing Ancestor $\Delta fimB::Kan$  and Ancestor $\Delta fimB::$ , and Hybrid $\Delta fimB::Kan$  and Hybrid $\Delta fimB::$ . Competitive indexes (CI) were obtained using the following formula:  $\log CFU[(\text{isolate1}/\text{isolate2})_{T_x}/(\text{isolate1}/\text{isolate2})_{T_0}]$ , CFU meaning colony forming unit and isolate1 being the first strain cited and isolate2 the second one in figure legends.

#### In vitro competitions in biofilm conditions

To determine the relative fitness of strains in biofilm conditions, they were grown in mixed colonies, with adaptations to what's previously described (15). O/N LB growth of each strain was diluted to obtain a suspension of approximately  $10^3$  cells/mL. Suspensions were then mixed two by two at 1:1 ratio and an amount of about 200 cells was plated on three polycarbonate filters (diameter: 25 mm, Sigma Aldrich) laid on a BHI agar plate. Cultures were kept at 37°C during seven days in aerobic and anaerobic conditions. At days 1, 4 and 7, filters were harvested in 1 mL of BHI broth and dilutions were plated on LB agar and LB agar with appropriate antibiotics (kanamycin 50 mg/L or ciprofloxacin 1 mg/L) to determine the relative amount of each strain. For each competition, the experience was repeated three times. CIs were obtained as described above.

#### Mouse intestinal colonization assays

Six-week-old female mice CD-1 from Charles River® (L'Arbresle, France) pre-treated with streptomycin before inoculation of challenging strains were used to assess strains' relative ability to colonize the mouse intestine, as previously described (12). Briefly, mice received water supplemented with streptomycin sulfate (5 g/liter) for five days in order to eliminate *E. coli*

from gut niche before inoculation, and were fed from then with sterile food until the end of the experiment. Streptomycin treatment was stopped five days before bacterial inoculation to allow the subsequent colonization of the mouse intestine by streptomycin-sensitive strains. At inoculation day, about  $10^6$  *E. coli* mixed at a 1:1 ratio were administered by force-feeding in 200  $\mu$ L of physiological water to mice free of coliform flora (controlled by plating the feces on Drigalski plates). At days 1, 4 and 7, the intestinal population of *E. coli* was estimated by plating dilutions of weighed fresh feces on LB agar and LB agar with appropriate antibiotics (kanamycin 50 mg/L or ciprofloxacin 1 mg/L). CIs were obtained as described above. At least five mice were used for each competition. To establish the potential role of the *fimB* gene, *in vivo* competitions between Ancestor, Hybrid, and their respective  $\Delta$ *fimB* mutants were also carried out.

#### Septicemia mouse model

Female mice OF1 of 14-16 g (4-week-old) from Charles River<sup>®</sup> were used to assess the strains' relative ability to cause sepsis, as previously described (16). Briefly, 200  $\mu$ l of a suspension of  $10^9$  *E. coli*/mL in physiological serum was inoculated by subcutaneous injection in the neck, either alone or mixed at a ratio of 1:1. Time to death was monitored during the following seven days, and all mice were frozen at -20°C at time of death. Mice surviving after 7 days were considered cured and were sacrificed. At least ten mice were used for strains tested alone and at least five mice for each competition assay. In all experiments, CFT073 strain, known to quickly kill any inoculated mouse, was used as positive control, and *E. coli* K-12 MG1655 strain, unable to kill any inoculated mouse, was used as negative control (17). Afterward, the spleens of all spontaneously dead mice were collected, weighed and pounded in physiological water. The infecting population of *E. coli* was estimated by plating dilutions of spleen suspensions on LB agar and/or LB agar with appropriate antibiotics (kanamycin 50 mg/L, ciprofloxacin 1 mg/L or ampicillin 100 mg/L). CIs were obtained as described above.

### Urinary tract infection mouse model

CBA female mice of 8-22g (8-week-old) from Janvier<sup>®</sup> were used to assess strains' relative ability to cause an ascending unobstructed urinary tract infection, as previously developed in our lab (18). Briefly, following a 12 h hydric restriction, anesthetized mice (using a xylazine/ketamine mixture) were infected with about  $10^8$  *E. coli* mixed at a 1:1 ratio in 50  $\mu$ L of physiological water, *via* the transurethral route into the bladder. Once the anesthetic effect achieved, hydric restriction was stopped. Mice were sacrificed 48 h after the bacterial inoculation. Bladder and kidneys were aseptically collected, weighed and pounded in 1 mL of physiological water. The population of *E. coli* was estimated by plating dilutions of bladder and kidneys suspensions on LB agar and/or LB agar with appropriate antibiotics (ciprofloxacin 1 mg/L or ampicillin 100 mg/L). Ten mice were used for each competition assay, and the experiments were repeated twice. Mice were considered infected if at least one colony grew on kidneys' LB agar plate, which corresponds to approximately 60-70 CFU/g of kidney. CIs were obtained as described above. In the absence of colony on LB agar with antibiotics, CI was calculated by considering the growth of five colonies, which is under the method detection limit and corresponds to about 30 CFU/g of kidney.

### **References**

1. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol J Comput Mol Cell Biol* 19:455–477.
2. Kallonen T, Brodrick HJ, Harris SR, Corander J, Brown NM, Martin V, Peacock SJ, Parkhill J. 2017. Systematic longitudinal survey of invasive *Escherichia coli* in England demonstrates a stable population structure only transiently disturbed by the emergence of ST131. *Genome Res* 27:1437–1449.



3. Ben Zakour NL, Alsheikh-Hussain AS, Ashcroft MM, Khanh Nhu NT, Roberts LW, Stanton-Cook M, Schembri MA, Beatson SA. 2016. Sequential acquisition of virulence and fluoroquinolone resistance has shaped the evolution of *Escherichia coli* ST131. *mBio* 7:e00347-00316.
4. Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinforma Oxf Engl* 30:2068–2069.
5. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, Fookes M, Falush D, Keane JA, Parkhill J. 2015. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinforma Oxf Engl* 31:3691–3693.
6. Croucher NJ, Page AJ, Connor TR, Delaney AJ, Keane JA, Bentley SD, Parkhill J, Harris SR. 2015. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res* 43:e15–e15.
7. Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22:2688–2690.
8. Letunic I, Bork P. 2019. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 47:W256–W259.
9. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6640–6645.
10. Flament-Simon S-C, Duprilot M, Mayer N, García V, Alonso MP, Blanco J, Nicolas-Chanoine M-H. 2019. Association between kinetics of early biofilm formation and clonal lineage in *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 10.
11. Totsika M, Beatson SA, Sarkar S, Phan M-D, Petty NK, Bachmann N, Szubert M, Sidjabat HE, Paterson DL, Upton M, Schembri MA. 2011. Insights into a multidrug resistant *Escherichia coli* pathogen of the globally disseminated ST131 lineage: genome analysis and virulence mechanisms. *PLOS ONE* 6:e26578.
12. Vimont S, Boyd A, Bleibtreu A, Bens M, Goujon J-M, Garry L, Clermont O, Denamur E, Arlet G, Vandewalle A. 2012. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone

O25b: H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities.  
PloS One 7:e46547.

13. Bleibtreu A, Gros P-A, Laouénan C, Clermont O, Le Nagard H, Picard B, Tenaillon O, Denamur E. 2013. Fitness, stress resistance, and extraintestinal virulence in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 81:2733–2742.
14. Diard M, Garry L, Selva M, Mosser T, Denamur E, Matic I. 2010. Pathogenicity-associated islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* are fitness elements involved in intestinal colonization. *J Bacteriol* 192:4885–4893.
15. Saint-Ruf C, Garfa-Traoré M, Collin V, Cordier C, Franceschi C, Matic I. 2014. Massive diversification in aging colonies of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 196:3059–3073.
16. Smati M, Magistro G, Adiba S, Wieser A, Picard B, Schubert S, Denamur E. 2017. Strain-specific impact of the high-pathogenicity island on virulence in extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol IJMM* 307:44–56.
17. Johnson JR, Clermont O, Menard M, Kuskowski MA, Picard B, Denamur E. 2006. Experimental mouse lethality of *Escherichia coli* isolates, in relation to accessory traits, phylogenetic group, and ecological source. *J Infect Dis* 194:1141–1150.
18. Labat F, Pradillon O, Garry L, Peuchmaur M, Fantin B, Denamur E. 2005. Mutator phenotype confers advantage in *Escherichia coli* chronic urinary tract infection pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44:317–321.

**Table S1. Strain collection:** characteristics known at collection time

Strain	Origin	Year	Source	O type	Phylo-group	<i>fimH</i>	Susceptibility		ESBL	Reference
							Nalidixic acid	Ciprofloxacin		
B11J12	France	2005	Blood	O25b	B2 sg1	<i>H22</i>	R	S	/	(1)
S250	France	2006	Feces	O25b	B2 sg1	<i>H22</i>	S	S	/	(2–5)
CES106C2	France	2007	Feces	O25b	B2 sg1	<i>H22</i>	S	S	+	(1)
H2381	Spain	2008	Blood	O25b	B2 sg1	<i>H22</i>	R	S	/	(6)
H3345	Spain	2011	Blood	O25b	B2 sg1	<i>H22</i>	R	S	+	This study
H1659	Spain	2005	Blood	O25b	B2 sg1	<i>H22</i>	S	S	/	(6, 7)
B7J19	France	2005	Blood	O25b	B2 sg1	<i>H22</i>	S	S	/	(1)
B12C27	France	2005	Blood	O25b	B2 sg1	<i>H22</i>	S	S	/	(1)
B5E11	France	2006	Blood	O25b	B2 sg1	<i>H22</i>	S	S	/	(1)
011-005	France	2009	Feces	O25b	B2 sg1	<i>H22</i>	S	S	/	(1)
001-001	France	2010	Feces	O25b	B2 sg1	<i>H22</i>	S	S	/	(1)
CES131C	France	2008	Feces	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	S	S	/	(1)
H219B	Spain	1993	Blood	O25b	B2 sg1	<i>H22</i>	S	S	/	(6)
H1447	Spain	2004	Blood	O25b	B2 sg1	<i>H22</i>	R	S	/	(6, 7)
H1698	Spain	2005	Blood	O25b	B2 sg1	<i>H22</i>	S	S	/	This study
196	France	2006	Feces	O25b	B2 sg1	<i>H22</i>	S	S	/	(5)
208	France	2006	Feces	O25b	B2 sg1	<i>H22</i>	S	S	/	(5)
H2262	Spain	2008	Blood	O25b	B2 sg1	<i>H22</i>	S	S	+	This study
005-019	France	2009	Feces	O25b	B2 sg1	<i>H22</i>	S	S	/	(1)
H1088	Spain	2001	Blood	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	S	S	/	This study
B1G9	France	2005	Blood	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	S	S	/	(1)
H2214	Spain	2007	Blood	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	S	S	/	This study
B1A5	France	2005	Blood	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	R	R	/	(1)
B1H12	France	2005	Blood	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	R	R	/	(1)
B2B2	France	2005	Blood	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	R	R	+	(1)
02	France	2006	Feces	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	R	R	/	(5)
39	France	2006	Feces	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	R	R	/	(5)
183	France	2006	Feces	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	R	R	/	(5)
187	France	2006	Feces	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	R	R	/	(5)
CES103C	France	2007	Feces	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	R	R	/	(1)
CES9C	France	2007	Feces	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	R	R	/	(1)
CES164C	France	2009	Feces	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	R	R	/	(1)
H3084B	Spain	2010	Blood	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	R	R	/	This study
C5	France	2012	Feces	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	R	R	+	(8)
TN03	France	2002	Urine	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	R	R	+	(9)
B5B6	France	2005	Blood	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	R	R	+	(1)
B12I1	France	2005	Blood	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	R	R	/	(1)
C23	France	2012	Feces	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	R	R	+	(8)
C3	France	2012	Feces	O25b	B2 sg1	<i>H30</i>	R	R	+	(8)

S susceptible; R: resistant; ESBL: extended-spectrum  $\beta$ -lactamase

**Table S2. Genome sequence quality**

Strain	Total length	Contigs number $\geq$ 200 bp	N50	Coverage
B11J12	5023916	88	397655	171
S250	4996154	46	363831	319
CES106C2	5201144	184	165664	190
H2381	5101792	122	319264	216
H3345	5276781	178	152436	182
H1659	5119271	92	156664	361
B7J19	5197897	104	190998	624
B12C27	5132487	84	218323	176
B5E11	5207580	86	229680	367
011-005	5076338	75	229700	551
001-001	5071451	101	274300	142
CES131C	5242271	163	252377	190
H219B	5079589	195	107365	435
H1447	5051027	163	100759	167
H1698	5285343	210	176589	461
196	5149407	117	264051	198
208	4823421	48	276186	239
H2262	5478956	137	197922	173
005-019	5335335	128	207935	163
H1088	5166149	119	173754	127
B1G9	5208454	92	274701	158
H2214	5136985	106	191559	176
B1A5	5245667	148	192869	143
B1H12	5171638	106	202829	157
B2B2	5253925	159	177015	177
02	5163272	184	190986	141
39	5144207	114	254637	183
183	5154965	112	201617	222
187	5198129	117	266172	153
CES103C	5083300	133	167460	151
CES9C	5116557	117	191275	152
CES164C	5045844	104	253401	124
H3084B	5030043	141	134534	169
C5	5149437	123	173754	230
TN03	5094470	79	331020	164
B5B6	5179486	98	223132	141
B12I1	5155390	100	229816	141
C23	5171332	162	201870	183
C3	5213867	167	175498	164

N50 is the sequence length of the shortest contig at 50% of the total genome length

Table S3. Primers used in this study

Assay and target region	Primer	Sequence (5'-3')	Reference
<b>Deletion</b>			
<i>fimB</i> (S250 and CES131C)	fimB_For_FRTKm	AAACATAATCAGGATTA AAAATGTTGGATTATTGCTAACCCAGCACAGCTAGTGCGCGTCTGTAATTATAAGGGAAA ACGgtgtaggctggagctgcttc	This study
	fimB_Rev_FRTKm	TAAATGGTTAATCATT TTTTGATATATCGTAAGAATAATGTAGTTTTTAACACCATCCCTGGTATCTCAACTATCTcatat gaatcctccttagtcc	This study
	fimB_F	AGCATGGCGTTTGTATGG	(5)
	fimB_R	CCCTGGTATCTCAACTATCTCT	(5)
	CES131cimB_verif_F	TTTCAGGCGTTATT CAGTGC	This study
	CES131cimB_verif_R	GATGTTGCGATTACTTCGCC	This study
<i>aadA2</i> (CES131C)	aadA_For_FRTKm	ATTCTGCGGTTCGGCTTACCTCGCCCGTTAGACATCATGAGGGAAGCGGTGgtgtaggctggagctgcttc	This study
	aadA_Rev_FRTKm	CGCGGTTCGGCTTGAACGAATTGTTAGACATCATTTACCAACTGACTTGATCATAtgaatcctccttagtcc	This study
	CES131CaadA_verif_F	TTTCAGGCGTTATT CAGTGC	This study
	CES131CaadA_verif_R	GATGTTGCGATTACTTCGCC	This study
Kanamycin resistance cassette	k2	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	(10)
	k1	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	(10)
<b>Complementation</b>			
<i>fimB</i>	fimB_cpSC-A_F	CGGACAAGATCACCCCTGCGT	This study
	fimBS250_cpSC-A_R	CAGGCGAATTTAAGTGATGT	This study
	fimB131C_cpSC-A_R	CAGGAGAATTTAAGTGATGT	This study
<b>Sequencing</b>			
<i>fimB</i>	Sanger_fimB_F	TCGACTTCCGGTGGTAA	This study
	Sanger_fimB_R	CACACGAATGGCGTAAC	This study
	pSC-A_insert_F	AAAGGGAACAAAAGCTGGGTA	This study
	pSC-A_insert_R	GTAAAACGACGGCCAGTGAG	This study

**Table S4. Plasmids used in this study**

Plasmid	Description	Reference
pKOBEG	pBR322 derivative containing the $\lambda$ Red region and <i>araC</i> gene of pKD46, CmR or TetR	(10)
pcp20	DH5 $\alpha$ derivative containing FLP recognition, AmpR, CmR	(11)
pSC-A-amp/kan-fimB-S250	vector containing the cloned S250 wild-type <i>fimB</i> gene, AmpR, KanaR	this study
pSC-A-amp/kan-fimBCES131C	vector containing the cloned CES131C wild-type <i>fimB</i> gene, AmpR, KanaR	this study
pSC-A-amp/kan-Control_Insert	control plasmid vector, AmpR, KanaR	this study

Cm: chloramphenicol; Tet: tetracycline; Amp: ampicilin; Kana: kanamycin; R: resistant

**Table S5. Genotypic and phenotypic analyses of strain collection**

Strain	<i>fimH</i>	Subclade	Virotype	β-Lactamase		Allele		Gene encoding resistance to		Plasmid Inc System	FAB formula/ pMLST	Col-like plasmids	Biofilm group
				non-ESBL	ESBL	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	Aminoglycosides	Other antibiotics				
B11J12	<i>H22</i>	B1	D3	TEM-1B	/	<i>gyrA1A</i>	<i>parC1</i>	<i>aac(3)-IVa, aph(4)-Ia</i>	/	FIB, FIC	F89:A-B62	156	++
S250	<i>H22</i>	B1	D3	/	/	<i>gyrA1a</i>	<i>parC1</i>	/	/	FIB, FIC	F89:A-B62	/	++
CES106C2	<i>H22</i>	B3	D4	/	CTX-M-1	<i>gyrA1a</i>	<i>parC2</i>	/	<i>sul2, tet(A)</i>	FIB, FIC, II	F18:A-B1, II-ST3	pVC	++
H2381	<i>H22</i>	B3	D4	TEM-1C	/	<i>gyrA1A</i>	<i>parC2</i>	/	<i>tet(A)</i>	FII, FIB, X1	F2:A-B1	MG828	++
H3345	<i>H22</i>	B3	D4	TEM-1C	SHV-12	<i>gyrA1A</i>	<i>parC2</i>	/	/	FII, FIB, FIC	F18:A-B1	pVC	++
H1659	<i>H22</i>	B4	D3	/	/	<i>gyrA1a</i>	<i>parC1</i>	/	/	FII, FIB	F29:A-B10	156	++
B7J19	<i>H22</i>	B4	D3	/	/	<i>gyrA1a</i>	<i>parC1</i>	/	/	FII, FIB	F29:A-B10	156	--
B12C27	<i>H22</i>	B4	D3	/	/	<i>gyrA1a</i>	<i>parC1</i>	/	/	FII, FIB	F29:A-B10	156, MG828	--
B5E11	<i>H22</i>	B4	D3	/	/	<i>gyrA1a</i>	<i>parC1</i>	/	/	FII, FIB	F29:A-B10	156	--
011-005	<i>H22</i>	B4	D3	/	/	<i>gyrA1a</i>	<i>parC1</i>	/	/	FII, FIB	F29:A-B10	156	++
001-001	<i>H22_like</i>	B4	ND	/	/	<i>gyrA1a</i>	<i>parC1</i>	/	/	FII, FIB	F29:A-B10	156	++
CES131C	<i>H30</i>	B4	ND	TEM-1B	/	<i>gyrA1a</i>	<i>parC1</i>	<i>aac(3)-IIa, aadA2</i>	<i>mph(A), sul1, tet(A), dfrA12</i>	FII, FIB	F2:A-B10	BSS12	++
H219B	<i>H22</i>	B5	D1	/	/	<i>gyrA1a</i>	<i>parC1</i>	/	/	FII, FIB	F24:A-B1	/	++
H1447	<i>H22</i>	B5	D1	TEM-1B	/	<i>gyrA1A</i>	<i>parC1</i>	<i>strA and B, aadA5</i>	<i>mph(B), sul12, tet(A), dfrA1</i>	FIB, FIC, Q1	F18:A-B8	/	++
H1698	<i>H22</i>	B5	D2	TEM-1C	/	<i>gyrA1a</i>	<i>parC1</i>	/	<i>tet(A)</i>	FII, FIB, X1	F2:A-B1	/	++
196	<i>H22</i>	B5	D1	TEM-1B	/	<i>gyrA1a</i>	<i>parC1</i>	<i>aadA1</i>	<i>sul1, tet(A), dfrA1</i>	FII, FIB	F24:A-B6	/	++
208	<i>H22</i>	B5	D1	/	/	<i>gyrA1a</i>	<i>parC1</i>	/	/	X1	/	156	++
H2262	<i>H22</i>	B5	D2	TEM-1A	CTX-M-9	<i>gyrA1a</i>	<i>parC1</i>	<i>aadB, aacA4, aadA2</i>	<i>qnrA1, sul1, tet(A), dfrA12</i>	FII, FIB, N, HI2	F2:A-B1, N-ST9, HI2-ST1	MG828	++
005-019	<i>H22</i>	B5	D1	TEM-1B	/	<i>gyrA1a</i>	<i>parC1</i>	<i>aadA1</i>	<i>sul1, tet(A), dfrA1</i>	FII, FIB	F24:A-B6	/	++
H1088	<i>H30</i>	C0	C2	TEM-1B	/	<i>gyrA1a</i>	<i>parC1a+A199G</i>	<i>aadA5</i>	<i>mph(A), sul1, dfrA17</i>	FII, FIA, FIB	F36:A1-B20	156, BSS12, IMG531	--
B1G9	<i>H30</i>	C0	C2	TEM-1B	/	<i>gyrA1a</i>	<i>parC1a</i>	<i>aadA5</i>	<i>mph(A), sul1, dfrA17</i>	FIA, FIB	F22:A1-B20	MG828	--
H2214	<i>H30</i>	C0	C2	/	/	<i>gyrA1a</i>	<i>parC1a</i>	/	/	FIA, FIB	F36:A1-B20	MG828	--
B1A5	<i>H30</i>	C1	C3	TEM-1B	/	<i>gyrA1AB</i>	<i>parC1aAB</i>	<i>aac(3)-IIa</i>	/	FII, FIA, FIB	F2:A2-B20	IMG531	++
B1H12	<i>H30</i>	C1	C3	TEM-1B	/	<i>gyrA1AB</i>	<i>parC1aAB</i>	<i>aadA5, strA and B</i>	<i>mph(A), sul1-2, tet(A), dfrA17</i>	FII, FIA, FIB	F1:A2-B20	156, IMG531	++
B2B2	<i>H30</i>	C1	C2	TEM-1B	CTX-M-14	<i>gyrA1AB</i>	<i>parC1aAB</i>	/	/	FII, FIA, FIB	F10:A2-B20	156, IMG531	--
02	<i>H30</i>	C1	C3	TEM-1B	/	<i>gyrA1AB</i>	<i>parC1aAB</i>	<i>aadA5</i>	<i>sul1, dfrA17</i>	FII, FIA, FIB, N	F1:A2-B20, N-UST	KPHS6	++
39	<i>H30</i>	C1	C2	TEM-1B	/	<i>gyrA1AB</i>	<i>parC1aAB</i>	<i>strA and B, aadA5</i>	<i>mph(A), sul1-2, tet(A), dfrA17</i>	FII, FIA, FIB	F1:A2-B20	BSS12, KPHS6	--
183	<i>H30</i>	C1	C3	TEM-1B	/	<i>gyrA1AB</i>	<i>parC1aAB</i>	/	/	FII, FIA, FIB, II, X1	F1:A2-B20, II-ST196	BSS12, IMG531	--
187	<i>H30</i>	C1	C3	TEM-1B	/	<i>gyrA1AB</i>	<i>parC1aAB</i>	<i>strA B, aadA5</i>	<i>mph(A), sul1-2, tet(A), dfrA17</i>	FII, FIA, FIB, II, X4	F1:A2-B20, II-UST	BSS12	++
CES103C	<i>H30</i>	C1	C3	TEM-1B	/	<i>gyrA1AB</i>	<i>parC1aAB</i>	<i>aac(3)-IIa</i>	/	FII, FIA, FIB	F1:A2-B20	BSS12	--
CES9C	<i>H30</i>	C1	C2	TEM-1B	/	<i>gyrA1AB</i>	<i>parC1aAB</i>	/	/	FII, FIA	F1:A2-B	IMG531	--
CES164C	<i>H30</i>	C1	C2	TEM-1B	/	<i>gyrA1AB</i>	<i>parC1aAB</i>	/	/	FII, FIA, FIB	F1:A2-B20	BSS12	--
H3084B	<i>H30</i>	C1	ND	TEM-1B	/	<i>gyrA1AB</i>	<i>parC1aAB</i>	<i>aac(3)-IIa</i>	/	FII, FIA, FIB, II, N	F1:A2-B20, II-UST, N-ST9	BSS12	++
C5	<i>H30</i>	C1-M27	C2	TEM-1B	CTX-M-27	<i>gyrA1AB</i>	<i>parC1aAB</i>	<i>strA and B, aadA5</i>	<i>mph(A), sul1-2, tet(A), dfrA17</i>	FII, FIA, FIB, II	F1:A2-B20, II-ST193	BSS12, IMG531	--
TN03	<i>H30</i>	C2	C2	TEM-1B, OXA-1	CTX-M-15	<i>gyrA1AB</i>	<i>parC1aAB</i>	<i>aac(3)-IIa, aac(6')Ib-cr</i>	<i>tet(A)</i>	FII, FIA	F2:A1-B	BSS12	--
B5B6	<i>H30</i>	C2	C2	TEM-1B, OXA-1	CTX-M-15	<i>gyrA1AB</i>	<i>parC1aAB</i>	<i>aac(3)-IIa, aac(6')Ib-cr</i>	/	FII, FIA	F2:A1-B	IMG531	++
B12II	<i>H30</i>	C2	ND	/	/	<i>gyrA1AB</i>	<i>parC1aAB</i>	/	/	FII, FIA	F2:A1-B	BSS12, IMG531	++
C23	<i>H30</i>	C2	ND	TEM-1B, OXA-1	CTX-M-15	<i>gyrA1AB</i>	<i>parC1aAB</i>	<i>aac(6')Ib-cr, aadA5</i>	<i>mph(A), sul1, tet(A), dfrA17</i>	FII, FIA	F2:A1-B	BSS12	--
C3	<i>H30</i>	C2	ND	TEM-1B, OXA-1	CTX-M-15	<i>gyrA1AB</i>	<i>parC1aAB</i>	<i>aac(6')Ib-cr, aadA5</i>	<i>mph(A), sul1-2, tet(A), dfrA17</i>	FII, FIA	F2:A1-B	BSS12	++

Inc: incompatibility; ND: not described; ++: early biofilm producer; +- delayed biofilm producer; -- never biofilm producer; UST: Unknown ST

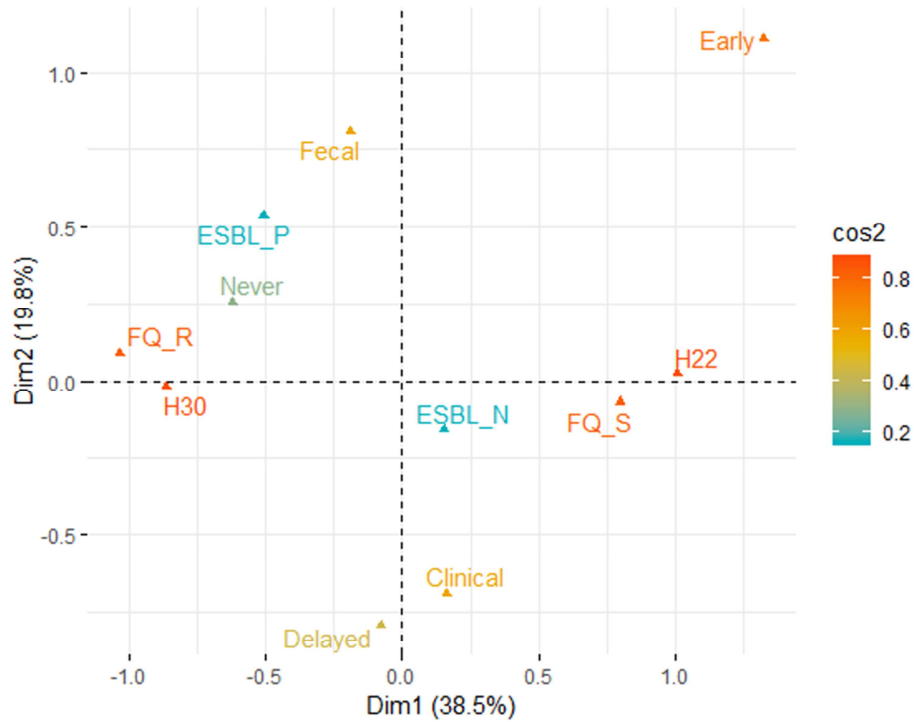
**Table S6. Main virulence factor (VF)-encoding genes**

Gene/status	N° (%) of isolates			P value B vs C
	Total (n=39)	Clade B (n=19)	Clade C (n=20)	
<b>Adhesin</b>				
<i>yfcV</i>	39 (100)	19	20	
<i>fimH</i>	39 (100)	19	20	
<i>papAH</i>	2 (5)	2	0	
<i>papC</i>	2 (5)	2	0	
<i>papEF</i>	3 (8)	2	1	
<i>sfa/foc</i>	1 (3)	0	1	
<i>afa/dra</i>	8 (21)	6	2	
<b>Toxin</b>				
<i>hlyA</i>	0	0	0	
<i>hlyF</i>	10 (26)	10	0	0,0002
<i>cnfI</i>	0	0	0	
<i>cdtB</i>	7 (18)	7	0	0,003
<i>sat</i>	25 (64)	7	18	0,0008
<i>vat</i>	0	0	0	
<i>tsh</i>	1 (3)	1	0	
<b>Iron Uptake</b>				
<i>iroN</i>	10 (26)	10	0	0,0002
<i>fyuA</i>	39 (100)	19	20	
<i>iutA</i>	32 (82)	14	19	
<i>iucD</i>	33 (82)	14	19	
<i>irp2</i>	39 (100)	19	20	
<i>chuA</i>	39 (100)	19	20	
<b>Capsule</b>				
<i>kpsMII</i>	33 (85)	19	14	0,02
<i>kpsMTIII</i>	0	0	0	
<i>K1</i>	3 (8)	3	0	
<i>K2</i>	0	0	0	
<i>K5</i>	29 (74)	16	14	
<b>Miscellaneous</b>				
<i>iss</i>	11 (28)	11	0	0,00005
<i>traT</i>	36 (92)	17	19	
<i>cvaC</i>	5 (13)	5	0	0,02
<i>ibeA</i>	17 (44)	17	0	3,00E-09
<i>usp</i>	39 (100)	19	20	
<i>ompT</i>	39 (100)	19	20	
<i>malX</i>	39 (100)	19	20	
Vf mean ± SD	15,6 ± 2,2	17,1 ± 2,1	14,3 ± 1,3	<0,0001

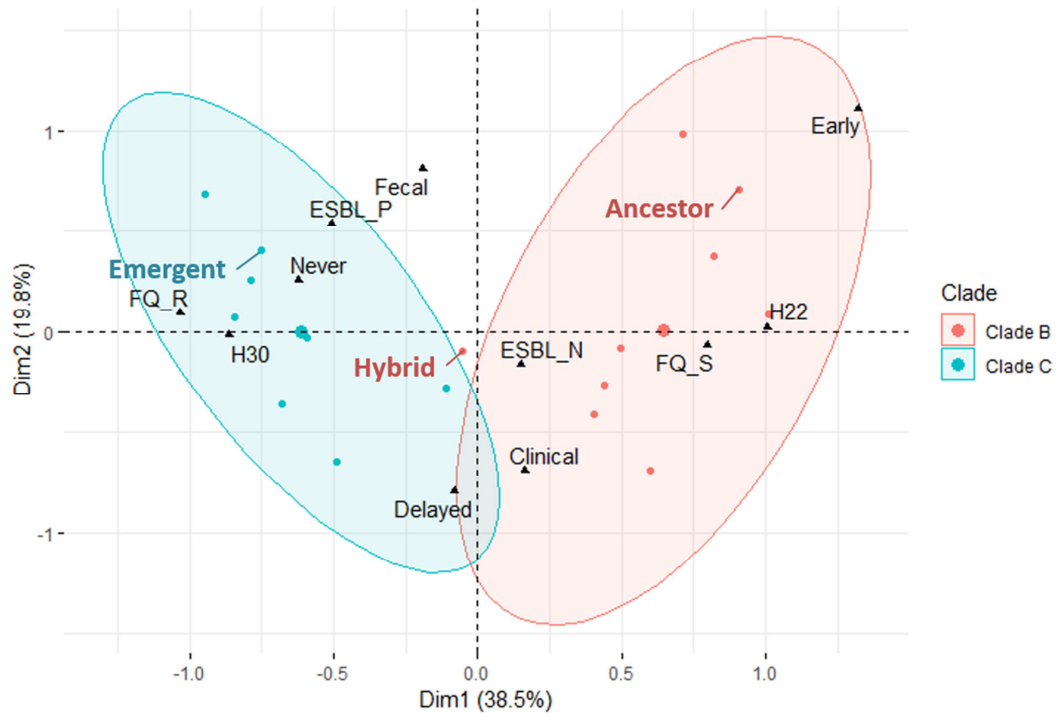
VF: virulence factors. SD: standard deviation. P values are obtained by Fisher's exact test and are shown when  $P < 0.05$ .



A.



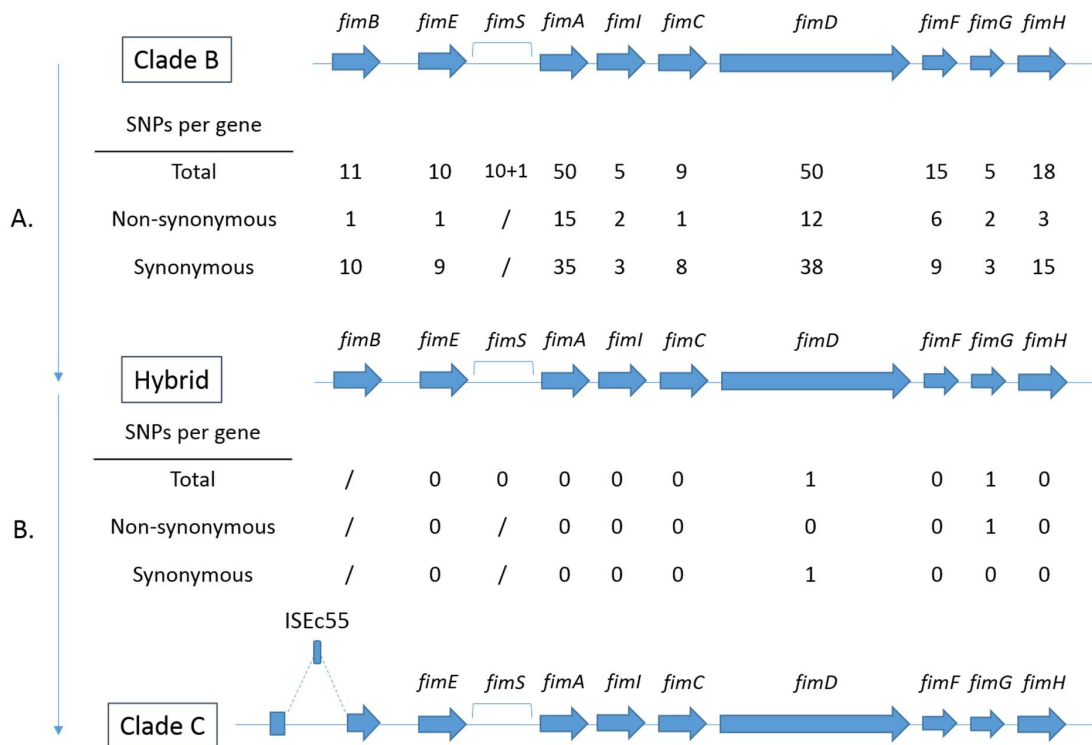
B.



**Figure S1. Multiple correspondence analyses (MCA) of the 39 *E. coli* ST131 strains.** (A) The variables are as follows: the sources (fecal or clinical sample), the *fimH* allele (*H22* or *H30*), fluoroquinolone (FQ) susceptibility (FQ\_S: susceptible to FQ or FQ\_R: resistant to FQ), the ESBL production (ESBL\_P: ESBL producer or ESBL\_N: non-ESBL producer), the biofilm production (early, delayed or never).  $\cos^2$ : square cosine (B) Plane projections on the Dim1-Dim2 of the variables and the strains. Strains or groups of strains are represented by colored circles: clade B in red and clade C in blue; circle size varies with the number of strain represented; variables are represented by black triangles. Locations of the three chosen strains, Ancestor, Hybrid and Emergent are pointed.



**Figure S2. Maximum likelihood phylogenetic tree.** This tree was built from non-recombinant SNPs using maximum likelihood, rooted on a clade A ST131 reference strain, SE15. Scale bar represents the average nucleotide substitutions per site. Branches are colored in accordance with subclades: B1 in yellow, B2 in pale orange, B3 in dark orange, B4 in red, B5 in pink, B0 in purple, C0 in pale blue, C1 in light green, C1-M27 in dark blue and C2 in dark green. Strains are named according to their origin : BZ for Ben Zakour *et al.*(12), K for Kallonen *et al.*(13) and D for this work.



**Figure S3. Schematic representation of the *fim* operon in a clade B strain, a clade C strains and Hybrid strain of subclade B4.** Genes are depicted by arrows except for *fimS* that is an invertible element, and the dotted lines represent ISEc55: the insertion sequence present within the *fimB* gene of all clade C strains. A. Comparison between a representative clade B strain and Hybrid. B. Comparison between Hybrid and a representative clade C strain. SNP: single nucleotide polymorphisms and their effect: non-synonymous and synonymous. The additional number indicates the presence of gap.

## References

1. Clermont O, Couffignal C, Blanco J, Mentré F, Picard B, Denamur E, COLIVILLE and COLIBAFI groups. 2017. Two levels of specialization in bacteraemic *Escherichia coli* strains revealed by their comparison with commensal strains. *Epidemiol Infect* 145:872–882.
2. Leflon-Guibout V, Blanco J, Amaqdouf K, Mora A, Guize L, Nicolas-Chanoine M-H. 2008. Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, among fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area of Paris, France. *J Clin Microbiol* 46:3900–3905.
3. Lavigne J-P, Vergunst AC, Goret L, Sotto A, Combescure C, Blanco J, O’Callaghan D, Nicolas-Chanoine M-H. 2012. Virulence potential and genomic mapping of the worldwide clone *Escherichia coli* ST131. *PloS One* 7:e34294.

4. Pantel A, Dunyach-Remy C, Essebe CN, Mesureur J, Sotto A, Pagès J-M, Nicolas-Chanoine M-H, Lavigne J-P. 2016. Modulation of membrane influx and efflux in *Escherichia coli* sequence type 131 has an impact on bacterial motility, biofilm formation, and virulence in a *Caenorhabditis elegans* model. *Antimicrob Agents Chemother* 60:2901–2911.
5. Nicolas-Chanoine M-H, Petitjean M, Mora A, Mayer N, Lavigne J-P, Boulet O, Leflon-Guibout V, Blanco J, Hocquet D. 2017. The ST131 *Escherichia coli* H22 subclone from human intestinal microbiota: Comparison of genomic and phenotypic traits with those of the globally successful H30 subclone. *BMC Microbiol* 17:71.
6. Mora A, Herrera A, Mamani R, López C, Alonso MP, Blanco JE, Blanco M, Dahbi G, García-Garrote F, Pita JM, Coira A, Bernárdez MI, Blanco J. 2010. Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates. *Appl Environ Microbiol* 76:6991–6997.
7. Mora A, Dahbi G, López C, Mamani R, Marzoa J, Dion S, Picard B, Blanco M, Alonso MP, Denamur E, Blanco J. 2014. Virulence patterns in a murine sepsis model of ST131 *Escherichia coli* clinical isolates belonging to serotypes O25b:H4 and O16:H5 are associated to specific virotypes. *PLoS ONE* 9:e87025.
8. Blanc V, Leflon-Guibout V, Blanco J, Haenni M, Madec J-Y, Rafteron G, Bruno P, Mora A, Lopez C, Dahbi G, Dunais B, Anastay M, Branger C, Moreau R, Pradier C, Nicolas-Chanoine M-H. 2014. Prevalence of day-care centre children (France) with faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* comprising O25b:H4 and O16:H5 ST131 strains. *J Antimicrob Chemother* 69:1231–1237.
9. Vimont S, Boyd A, Bleibtreu A, Bens M, Goujon J-M, Garry L, Clermont O, Denamur E, Arlet G, Vandewalle A. 2012. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone O25b: H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities. *PloS One* 7:e46547.
10. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6640–6645.
11. Cherepanov PP, Wackernagel W. 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of F1p-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158:9–14.

12. Ben Zakour NL, Alsheikh-Hussain AS, Ashcroft MM, Khanh Nhu NT, Roberts LW, Stanton-Cook M, Schembri MA, Beatson SA. 2016. Sequential acquisition of virulence and fluoroquinolone resistance has shaped the evolution of *Escherichia coli* ST131. *mBio* 7:e00347-00316.
13. Kallonen T, Brodrick HJ, Harris SR, Corander J, Brown NM, Martin V, Peacock SJ, Parkhill J. 2017. Systematic longitudinal survey of invasive *Escherichia coli* in England demonstrates a stable population structure only transiently disturbed by the emergence of ST131. *Genome Res* 27:1437–1449.

# Discussion

---

Dans le contexte actuel de l'émergence mondiale du clone *E. coli* ST131 multirésistant aux antibiotiques, l'objectif de ce travail était de tenter de comprendre quels facteurs pouvaient être à l'origine de la réussite de ce clone. Dans ce but, nous avons tout d'abord constitué une collection de souches ST131 que nous avons caractérisées et dont nous avons séquencé les génomes entiers. Puis nous avons étudié l'histoire évolutive de ST131 (i) en explorant la dynamique de ses sous-clades dans les *E. coli* responsables de bactériémies d'une étude anglaise et (ii) en comparant d'un point de vue phénotypique les souches ST131 ancestrales du clade B aux souches ST131 émergentes du clade C de notre collection. Nous avons ainsi investigué les rôles potentiels de facteurs autres que l'antibiorésistance, tels que le taux de croissance, la formation de biofilm, la capacité de colonisation et la virulence dans le succès des souches ST131 de clade C. Pour cela, de multiples modèles ont été développés : tant *in vitro* (formation de biofilm précoce, croissance en conditions planctoniques et en conditions de biofilm mature, de manière à se rapprocher davantage d'une situation de colonisation) qu'*in vivo* chez la souris. Les modèles murins nous ont permis de reproduire différentes situations écologiques ou cliniques : le commensalisme intestinal, l'infection urinaire et la septicémie par voie transcutanée. L'originalité de ce travail réside dans la mise en compétition de souches de *E. coli* ST131 de clade B et de clade C dans ces différents modèles.

Dans la littérature, les différences phénotypiques et/ou épidémiologiques des souches ST131 en fonction des clades, et *a fortiori* des sous-clades, sont rarement étudiées dans le détail. La différenciation se résume dans la majorité des cas à « ST131 H30 » (clade C) et « non-H30 » (clades autres que C). Aussi avons-nous souhaité explorer la répartition des sous-clades de ST131 en utilisant les données de séquençage de génomes entiers de souches ST131 provenant d'une étude portant sur des *E. coli* responsables de bactériémies et collectées de manière systématique en Angleterre entre 2001 et 2012, et dont les ST, ainsi que les clades pour les souches ST131, étaient disponibles<sup>133</sup>. Comme attendu, le clade C était le clade dominant, en particulier le sous-clade C2, et parmi les sous-clades B, B4 et B5 qui sont les plus proches du clade C, étaient les plus représentés. Les sous-clades intermédiaires que sont B0 et C0 étaient de leur côté très peu représentés, ce qui pourrait être le reflet de stades transitoires présentant un moindre fitness avant l'acquisition d'adaptations évolutives au sein du clade C. Il est intéressant de noter que le clade B de ST131, bien que quantitativement moins fréquent, a persisté dans les infections cliniques à hauteur de 16,5% des souches de ST131 dans l'étude anglaise, et n'a pas été totalement supplantés par le clade C multirésistant aux antibiotiques. Cette persistance du clade B, sensible aux fluoroquinolones, a



aussi été trouvée dans deux études espagnoles : l'étude nationale sur les souches cliniques de *E. coli* en 2009 où le clade B représentait 27% des ST131<sup>338</sup>, et une étude de 2016 où 36,4% des *E. coli* ST131 bactériémiques non producteurs de BLSE appartenaient au clade B<sup>134</sup>. Ces différentes descriptions indiquent que les souches ST131 de clade B persistent dans les infections extra-intestinales, mais sans connaître l'essor des souches de clade C.

La collection que nous avons constituée à partir d'isolats de portage digestif et d'isolats cliniques était composée de souches représentatives des clades et sous-clades B et C de ST131 (à l'exception des sous-clades B2 et B0). L'étude de la capacité de croissance en milieu riche des souches de cette collection a révélé un fitness (estimé par le MGR) similaire entre les souches de clade B et de clade C, entre les souches fécales et cliniques et entre les souches résistantes et sensibles aux fluoroquinolones. Ce dernier résultat corrobore ce qui est rapporté dans la littérature, à savoir que les mutations des gènes *gyrA* et *parC* responsables de la résistance aux fluoroquinolones chez *E. coli* ST131 sont celles qui induisent une moindre perte de fitness<sup>272</sup>.

Au sein de notre collection, les souches du clade B étaient de meilleures productrices de biofilm précoce que celles du clade C, ce qui renforce les résultats précédemment obtenus avec la technique du BRT<sup>®</sup>, que ce soit au sein des souches ST131 d'une large collection de *E. coli* ou au sein de quelques souches ST131 sélectionnées<sup>150,287,339</sup>. Surgers *et al.*, utilisant également la technique du BRT<sup>®</sup>, ont décrit que la production de biofilm précoce était moins fréquente chez les ST131 que chez d'autres ST de *E. coli*, mais n'ont pas noté de différence quant à la cinétique de formation de biofilm précoce au sein des souches ST131<sup>323</sup>. Ceci s'explique par le critère de sélection de leurs souches, à savoir la production de BLSE, critère qui exclut la majorité des souches de *E. coli* ST131 de clade B qui sont les seules capables de former du biofilm très précoce au sein de ST131, à l'instar de rares clones de *E. coli*<sup>339</sup>. Nos résultats du yeast agglutination test standard ne sont pas en adéquation avec ceux obtenus par Sarkar *et al.*<sup>326</sup>, qui ont montré que seulement 14% de leurs ST131 de clade C exprimaient leurs fimbriae de type 1 après 24 h de culture sous agitation, contre 90% dans notre étude. Cette dissemblance pourrait être imputée à des conditions expérimentales différentes. Par ailleurs, dans notre travail, les résultats du yeast agglutination test précoce (mis au point dans nos travaux) et du test au rouge Congo étaient concordants avec la cinétique de formation de biofilm observée chez nos souches. En effet, 100% des souches formant du biofilm en 2 h exprimaient

<sup>338</sup> J. Blanco *et al.*, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **66**: 2011–2021, 2011.

<sup>339</sup> S.-C. Flament-Simon *et al.*, *Frontiers in Microbiology*, **10**: 1183, 2019.

précocement leurs fimbriae de type 1 et synthétisaient curli et cellulose [morphotype rdar (rough dry and red)], contre 7 et 20% des souches ne formant pas de biofilm précoce, respectivement. Ces résultats sont cohérents avec l'implication des fimbriae de type 1 et des curli dans la phase d'adhésion, qui est la première étape de formation du biofilm<sup>301</sup>. Au sein du clade B, nous avons observé une association entre le sous-clade d'appartenance et la cinétique de formation de biofilm précoce. Ainsi, les souches du sous-clade B5 étaient plus fréquemment productrices de biofilm précoce que celles du sous-clade B4. À l'inverse, aucune association n'a été mise en évidence entre les sous-clades C et le phénotype biofilm des souches. Tous ces résultats montrent que la perte de la capacité à former du biofilm précoce n'est pas survenue de façon linéaire et graduelle depuis les souches du sous-clade B1, sous-clade B le plus ancestral, jusqu'à celles du clade C.

Pour mieux apprécier le fitness de nos souches, nous avons fait appel à des expériences de compétition entre des souches de *E. coli* ST131 appartenant au clade B et au clade C, expériences jamais rapportées jusqu'alors. Deux souches représentatives des clades B et C ont été sélectionnées et nommées Ancêtre et Émergente, respectivement. Une troisième souche nommée Hybride a également été sélectionnée. En effet, cette souche a retenu notre attention car elle appartient au sous-clade B4 mais possède un opéron *fim* de type *H30*, habituellement spécifique du clade C. La seule distinction notable entre l'opéron standard *fimH30* et celui de notre souche Hybride est l'absence de la séquence d'insertion ISEc55 dans le gène *fimB* de la souche Hybride. Cette découverte est rare mais pas inédite, puisque la collection ST131 de Ben Zakour *et al.* comprenait aussi une souche de ce type appartenant au sous-clade B4<sup>78</sup>. Ces deux souches B4 « hybrides » présentent un intérêt d'un point de vue évolutif. Elles indiquent en effet que la recombinaison modifiant l'opéron *fim* de type *fimH22* en *fimH30* qui a façonné l'évolution du clade C aurait eu lieu à plusieurs reprises dans l'histoire de ST131. Au sein du sous-clade B4, cette recombinaison semble être apparue dans un environnement génétique *a priori* non favorable, puisqu'elle n'aura pas connu le succès qu'elle a rencontré dans l'environnement génétique du clade C. Par ailleurs, l'absence de ISEc55 dans le gène *fimB* de notre souche Hybride semble indiquer que la recombinaison *fimH22* à *fimH30* ait été antérieure à l'insertion de ISEc55 dans le gène *fimB* dans la chronologie évolutive des souches de clade C. Enfin, cette souche Hybride présente un intérêt expérimental car elle permet d'étudier une souche possédant un opéron *fim* de clade C dans un environnement génétique de clade B, opéron dont nous nous sommes davantage rapprochés en créant un mutant Hybride $\Delta$ *fimB*.

Globalement, lors des expériences menées *in vivo*, les trois souches sélectionnées, Ancêtre, Hybride et Émergente ont été capables de coloniser à long terme l'intestin de la souris (sept jours post-inoculation), ce qui confirme les résultats observés par Vimont *et al.* pour une souche de clade C<sup>332</sup>. Ces données de colonisation à long terme ne sont pas disponibles pour l'UTI car dans notre modèle, l'observation de l'UTI n'allait pas au-delà de 48 h. D'autre part, une grande virulence a été observée pour les trois souches testées, puisqu'elles ont été chacune en mesure de provoquer la mort de 100% des souris après injection sous-cutanée, virulence auparavant décrite par Clermont *et al.* pour une souche de clade C dans un modèle murin de septicémie similaire au nôtre<sup>58</sup>. Une autre étude utilisant le même modèle a trouvé une virulence inférieure à la nôtre, avec moins de 10% de mortalité induite par des souches ST131 de clades B et C<sup>209</sup>. Dans cette étude néanmoins, la moitié des souches étaient isolées de plaies chroniques, contexte clinique qui aurait pu sélectionner des phénotypes particuliers, davantage persistants que virulents, et la totalité des souches ST131 étaient productrices d'OXA-48, résistance qui pourrait induire un coût impactant le fitness et de ce fait la virulence des souches.

En conclusion, les trois souches sélectionnées dans le cadre de ce travail, toutes isolées de fèces, se sont montrées virulentes et capables de coloniser intestins et tractus urinaire de la souris. Ce fait, associé à l'absence de différence de fitness *in vitro* entre toutes nos souches d'origine clinique et de portage fécal, suggère que *E. coli* ST131 semble être qualifié à la fois pour le commensalisme et la virulence extra-intestinale, considération faisant écho à l'idée que la virulence ne serait qu'une dérive du commensalisme chez *E. coli*<sup>30</sup>.

Concernant la mise en compétition deux à deux de nos trois souches, aucune différence n'a été observée entre elles dans les compétitions faites *in vitro* en conditions planctoniques (Tableau 2). Ce fut également le cas dans les compétitions faites en biofilm mature sur milieu riche, en aérobie comme en anaérobie (Tableau 2), où la cinétique de formation de biofilm précoce (Ancêtre et Hybride sont productrices de biofilm en 2 h et 5 h d'incubation, respectivement, et Émergente est non productrice en 5 h) ne semble pas jouer de rôle (Tableau 2). Il existe néanmoins une tendance, certes non significative, des souches Ancêtre et Hybride à prédominer sur la souche Émergente en condition de biofilm mature, en anaérobie uniquement.

**Tableau 2. Bilan des compétitions entre les trois souches sélectionnées : Ancêtre (A), Émergente (E) et Hybride (H), et leurs éventuels mutants  $\Delta fimB$  ( $\Delta$ )**

Compétition	MGR aérobie	Biofilm mature	Colonisation intestinale	Sepsis (Kaplan Meier)	Sepsis en compétitions	UTI vessie	UTI reins
<b>A, E et H</b>	A=E=H	A=E=H	A>E; A=H; H=E	A>E; A>H; H=E	A>E; A>H; H>E	A>E; A=H; H>E	A>E; A=H; H=E
<b>A et A<math>\Delta fimB</math></b>	A=A $\Delta$	A=A $\Delta$	A=A $\Delta$	A=A $\Delta$	A=A $\Delta$	ND	ND
<b>H et H<math>\Delta fimB</math></b>	H=H $\Delta$	H=H $\Delta$	H=H $\Delta$	H=H $\Delta$	H=H $\Delta$	ND	ND

MGR: taux maximum de croissance; ND : non disponible

En revanche, les compétitions en modèle murin ont montré que la souche Ancêtre surpassait la souche Émergente pour l'ensemble des expériences de compétition : colonisation intestinale, septicémie et colonisation de l'arbre urinaire (Tableau 2).

Bien qu'aucune comparaison entre souches de clade B et clade C dans le modèle de colonisation intestinale de la souris n'existe dans la littérature, il est à noter que Sarkar *et al.* ont exploré les capacités d'adhésion de quelques souches de clade B et C à des cellules intestinales, obtenant des résultats apparemment indépendants du type de clade<sup>330</sup>.

À l'inverse de la colonisation intestinale, la littérature est relativement riche d'études en modèle de septicémie chez la souris. Bleibtreu *et al.* ont montré que chez *E. coli*, le fitness *in vitro* n'était pas corrélé à la virulence des souches dans un modèle murin de septicémie<sup>264</sup>. C'est effectivement ce que nous avons observé dans notre étude, où malgré l'absence de différence de fitness *in vitro*, la souche Ancêtre était de loin la plus virulente avec un niveau de virulence similaire à celui du témoin positif, CFT073. Une virulence plus importante de notre souche Ancêtre comparée à d'autres souches ST131 avait déjà été notée dans le modèle de l'embryon de zebrafish<sup>288</sup>. Dans un modèle de septicémie chez la souris, Johnson *et al.* ont, eux, observé une hétérogénéité de virulence au sein de ST131 avec une tendance à une plus forte virulence chez les souches ST131 sensibles aux fluoroquinolones (appartenant *a priori* au clade B) que chez celles résistantes (appartenant *a priori* au clade C), se traduisant par une mortalité moyenne de 50% contre 20%, respectivement<sup>289</sup>. En revanche, le contraire a été observé dans une étude utilisant le même modèle murin de septicémie sur une vingtaine de souches ST131, où les souches de virotype D, virotype spécifique du clade B, étaient en moyenne moins virulentes que celles présentant des virotypes associés au clade C<sup>285</sup>.

Nos travaux montrent une moindre virulence des souches de clade C comparativement aux souches de clade B, tant d'un point de vue phénotypique *via* les modèles de compétitions chez la souris que d'un point de vue génotypique *via* le nombre moyen de gènes codant des VFs associés

aux ExPEC. L'étude de de Toro *et al.* montrait des résultats similaires aux nôtres au regard du nombre moyen de gènes codant des VFs chez ST131<sup>209</sup>.

Comme pour les modèles septicémiques, la littérature est relativement riche en modèles de colonisation du tractus urinaire chez la souris. Ainsi, le clade C de ST131, qui est l'un des clones UPECs les plus fréquents, a été observé à des concentrations supérieures à celles d'autres souches UPECs, tant dans la vessie et que dans les reins<sup>332</sup>. Dans nos travaux, les souches de clade B sont de meilleures colonisatrices de l'arbre urinaire que la souche Émergente (clade C), tant dans la vessie que les reins pour la souche Ancêtre et uniquement dans la vessie pour la souche Hybride. Dans l'étude de Vimont *et al.* précédemment citée<sup>332</sup>, des concentrations supérieures de la souche ST131 de clade C ont été observée sept jours après inoculation. Trois différences sont à remarquer entre notre modèle et celui de Vimont *et al.* qui pourraient expliquer les dissemblances observées : (i) la durée d'infection, qui était de 48 h dans notre étude contre sept jours dans la leur, (ii) le sous-clade C d'appartenance de la souche, C1 dans notre étude contre C2 dans la leur et enfin (iii) le design de l'étude, avec une comparaison de souches en compétition dans un même animal dans notre étude, contre une comparaison de souches inoculées individuellement à des animaux distincts dans la leur.

Une éventuelle explication de l'infériorité de la souche Émergente mise en compétition avec les souches Ancêtre et Hybride dans notre modèle urinaire pourrait résider dans des différences d'expression du fimbriae de type 1, qui est l'un des facteurs de virulence nécessaire à la colonisation du tractus urinaire<sup>35</sup>. En effet, cette expression est plus rapide chez les souches Ancêtre et Hybride que chez la souche Émergente d'après le yeast agglutination test précoce. De leur côté, Sarkar *et al.* ont montré que, chez certaines souches de clade C n'exprimant pas de fimbriae de type 1, au bout de 24 h de croissance sous agitation, plusieurs repiquages en croissance statique pouvaient activer leur expression<sup>326</sup>. Utilisant cette donnée, Totsika *et al.* ont effectivement décrit qu'une souche de clade C colonisait mieux l'arbre urinaire de la souris après une culture over night statique qu'après une culture over night sous agitation, montrant ainsi le rôle essentiel des fimbriae de type 1 dans la colonisation de l'arbre urinaire. Bien que dans notre étude, les trois souches mises en compétition deux à deux dans le modèle urinaire murin exprimaient leurs fimbriae de type 1 de manière qualitativement égale (yeast agglutination test) au moment de l'inoculation, c'est-à-dire après 24 h de culture over night sous agitation, il est difficile de conclure sur le rôle potentiel de la cinétique et de l'expression de fimbriae de type 1 dans les différences de colonisations urinaires observées entre les souches de clades B et C. Pour palier cela, des expériences d'UTI en compétition

utilisant une souche de clade B et une de clade C inoculées après 24 h de culture en conditions statiques, voire à la suite de repiquages statiques, pourraient être menées.

Toutefois, pour tenter d'aller plus loin dans l'exploration du rôle du fimbriae de type 1 et de la cinétique de la formation biofilm précoce, nous avons fait appel aux données moléculaires. Totsika *et al.* et Sarkar *et al.* ont montré qu'un mutant qui n'est plus capable de synthétiser de fimbriae de type 1 colonise moins bien l'intestin de souris non traitées à la streptomycine (chez lesquelles la niche intestinale n'a donc pas été libérée des entérobactéries murines), adhère moins bien aux cellules intestinales et colonise également moins bien le tractus urinaire de la souris que sa souche mère<sup>79,330</sup>. Connaissant la plus grande précocité des souches de clade B à exprimer leurs fimbriae de type 1 et à former du biofilm, nous avons fait l'hypothèse que l'inactivation du gène *fimB* chez toutes les souches de clade C *via* l'insertion de ISEc55 pouvait être en cause dans les différences observées, compte tenu que ce gène code une recombinase régulant l'expression du fimbriae de type 1. Les expériences menées avec les mutants de clade B Ancêtre $\Delta$ *fimB* et Hybride $\Delta$ *fimB*, construits pour mimer l'inactivation du gène *fimB* des souches de clade C, et leurs souches mères ont apporté quelques éléments de réponse.

Ainsi, l'absence du gène *fimB*, chez les souches Ancêtre et Hybride a entraîné une perte de leur capacité à former du biofilm précoce et, leur complémentation par le gène *fimB* sauvage a restauré cette capacité. Toutefois, la démonstration du lien entre absence de production de biofilm précoce et inactivation du gène *fimB* chez la souche Émergente (complémentation par un gène sauvage *fimB* de souche de classe C) n'a pas été faite dans notre étude.

En revanche, les expériences faites en modèle murin avec les souches Ancêtre $\Delta$ *fimB* et Hybride $\Delta$ *fimB* en compétition avec leur souche parentale ont montré que l'inactivation du gène *fimB* ne semble pas influencer sur la capacité des souches Ancêtre et Hybride à coloniser l'intestin ni sur leur virulence *in vivo*, indiquant que la capacité à former du biofilm précoce ne jouerait pas de rôle dans ces modèles murins. Nos résultats sont en accord avec ceux de Diard *et al.* qui concluaient que la capacité à former du biofilm sur des surfaces abiotiques ne semblait pas être corrélée à la capacité de coloniser durablement l'intestin des souris<sup>30</sup>. Nos résultats sont aussi en accord avec une récente étude dans laquelle aucune différence n'a été mise en évidence dans un modèle de colonisation intestinale post-traitement à la streptomycine chez la souris entre une souche ST131 de clade C dont le gène *fimH* (codant l'adhésine du fimbriae de type 1) a été délété et sa souche mère, et ce, 10 jours après inoculation<sup>330</sup>. Il faut toutefois noter que dans cette étude, l'expérience

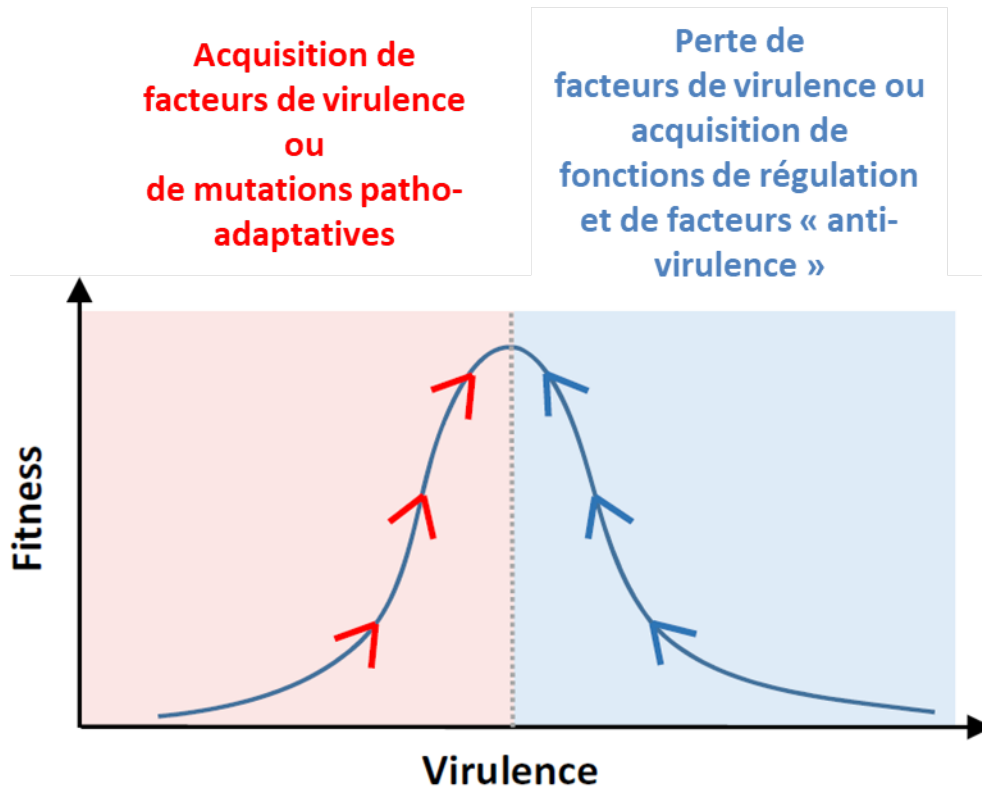
n'a pas été réalisée dans un modèle de compétition entre deux souches et qu'en conséquences, des différences de fitness fines pourraient être passées inaperçues. Bien que les résultats de notre étude indiquent que le phénotype de formation de biofilm précoce ne semble pas permettre d'expliquer les phénotypes observés *in vivo*, il est hasardeux de conclure que cela ne joue aucun rôle dans les capacités de colonisation intestinale des souches de clade B et C observées, tant que la souche Émergente n'a pas été mise en compétition avec la souche Ancêtre $\Delta fimB$ , ainsi qu'avec la souche Hybride $\Delta fimB$ , dans le modèle murin de colonisation intestinale.

En conclusion, d'un côté, toutes nos expériences réalisées *in vivo* suggèrent que les *E. coli* ST131 de clade C sont moins virulents et de moins bons colonisateurs que leur ancêtre de clade B et que cela ne peut être expliqué par l'inactivation du gène *fimB*, et de l'autre, notre analyse de l'évolution des fréquences relatives des différentes sous-clade B et C au sein des *E. coli* bactériémiques collectés en Angleterre de 2001 à 2012 montre la supériorité épidémiologique des souches de clade C, ainsi que la persistance à basse fréquence des souches de clade B. Peut-on considérer ces pertes de virulence et de capacité de colonisation comme des atouts, qui participent à l'acquisition d'un meilleur fitness par les souches de clade C, leur permettant d'atteindre et de persister dans de nouvelles niches écologiques et populations hôtes autres que celles atteintes par les souches du clade B ?

Si l'on se réfère à la publication de Diard et Hardt<sup>263</sup>, cette hypothèse est plausible puisqu'en ce qui concerne la virulence, tout réside dans la notion de compromis. En effet, une forte virulence bactérienne risque de causer chez l'hôte infecté des dommages importants, susceptibles de nuire à la transmission de la souche infectante, et de diminuer conséquemment son fitness. Comme représenté en Figure 14, la perte de facteurs de virulence ainsi que l'acquisition de fonctions de régulation ou de facteurs anti-virulences chez un micro-organisme peuvent permettre une augmentation de son fitness dans un contexte écologique donné. Ce phénomène a été remarquablement illustré avec le virus de la myxomatose chez les lapins en Australie. Suite à l'introduction de ce virus sur le continent dans les années 50, une évolution sélective s'est opérée dans la population virale à la faveur de variants moins virulents que les souches initialement introduites<sup>340</sup>.

---

<sup>340</sup> P. J. Kerr., *Antiviral Research*, **93**: 387–415, 2012.



**Figure 14. Dynamique évolutive de la virulence dans un contexte écologique donné, d'après Diard et Hardt<sup>263</sup>.**

La perte de gènes serait-elle une des clefs du succès du clade C de ST131 ? C'est un argument avancé par Shaik *et al.*, qui ont mis en évidence l'absence de 142 protéines chez ST131 comparativement à trois autres ST de ExPEC producteurs de BLSE mondialement répandus: ST38, ST405 et ST648<sup>280</sup>. Cette perte de protéines incluant des protéines de membrane, des régulateurs transcriptionnels, des protéines chaperones, des lyases et des hydrogénases indiquerait que ST131 utilise la perte de gènes comme mécanisme évolutif, afin d'optimiser son fitness.

Néanmoins, tout au long de l'évolution de ST131, du sous-clade B1 basal jusqu'au sous-clade C2, une accumulation du nombre de gènes de résistance a été observée. La stratégie évolutive de *E. coli* ST131 consisterait-elle, d'une part, en une perte de facteurs de virulence lui permettant la colonisation de nouvelles niches écologiques, et d'autre part, en un gain de gènes codant la résistance aux antibiotiques, lui permettant de survivre dans ces mêmes niches soumises à la pression antibiotique ?

Cette hypothèse est confortée par les résultats de différentes études épidémiologiques. Ainsi, l'étude de Liu *et al.* montre que les souches ST131 de clade B, plus sensibles aux antibiotiques que les souches de clade C, semblent plutôt infecter des populations d'âge moyen alors que les souches de clade C semblent infecter les population âgées, donc plus exposées aux antibiotiques<sup>110</sup>. Elle



décrit de plus que les souches de clade C seraient davantage responsables d'infections urinaires asymptomatiques que les souches de clade B (56% contre 38%), infections qui constituent une niche écologique permettant une bonne transmission des souches de clade C, leur assurant de ce fait un fitness élevé. En effet, les infections urinaires peuvent être considérées comme une impasse écologique pour toute bactérie, puisque les désagréments qu'elles provoquent entraînent la prise d'un traitement antibiotique approprié, éliminant la bactérie infectante. À l'inverse, les bactériuries asymptomatiques permettent à la bactérie d'essaimer dans l'environnement à des concentrations pouvant avoisiner celles des fèces<sup>9,337</sup>. Les études qui abordent les facteurs de risque d'infection ou de portage de ST131 montrent que les facteurs associés au ST131 (majoritairement de clade C) sont le fait d'être âgé, d'être hospitalisé en long séjour ou d'être dans un contexte associé aux soins, autant de facteurs qui suggèrent une forte exposition aux antibiotiques<sup>37,100,138</sup>. Par ailleurs, il a été décrit qu'une amélioration du fitness de *E. coli* dans le tractus urinaire serait corrélée à une diminution de son fitness dans le tractus intestinal. En effet, les protéines FimH possédant une plus grande affinité aux résidus mono-mannoses tapissant le tractus urinaire seraient *in fine* délétères dans l'environnement intestinal, compte tenu que ces FimH sont plus sujets à l'inhibition induite par les glycoprotéines mannosylées solubles qui abondent dans la muqueuse gastro-intestinale<sup>341</sup>.

Bien qu'originaux, nos travaux présentent de nombreuses limites. D'une part, nous n'avons testé en compétition qu'un petit nombre de souches, un plus grand nombre de souches mériterait d'être testé dans nos conditions expérimentales ; d'autre part, nous avons fait le choix d'utiliser une souche de sous-clade C1 comme représentante du clade C et non une souche de sous-clade C2, de sorte à s'affranchir du poids éventuel des multiples gènes de résistances observés chez les souches de sous-clade C2, en plus du gène *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Il serait néanmoins intéressant de soumettre une souche de sous-clade C2 aux mêmes expériences de compétition.

Enfin, nos modèles ne reflètent pas exactement la physiologie de l'infection urinaire et du sepsis. En effet, toutes les étapes préliminaires de colonisation périnéale, d'ascension de l'uretère pour l'UTI ou d'invasion des cellules épithéliales et de translocation pour le sepsis en sont absentes. Ces manques sont d'autant plus importants dans le modèle urinaire compte tenu des diversités relatives au fimbriae de type 1 que nous avons observées dans nos travaux (*fimH22* et *fimH30*, *fimB* fonctionnel ou non), qui sont directement impliquées dans la physiologie de l'UTI (affinités différentes aux résidus mannosés et expressions différentes du fimbriae de type 1). En effet, ces facteurs entrent en

---

<sup>341</sup> S. Chattopadhyay *et al.*, *Journal of Molecular Evolution*, **64**: 204, 2006.

jeu dans l'ascension de l'urètre par les bactéries, étape absente de notre modèle puisque les bactéries sont directement inoculées dans la vessie *via* un cathéter.

# Perspectives

---

Nos travaux ouvrent la voie à de multiples possibilités d'études, qui permettraient d'approfondir les résultats obtenus.

De toutes les possibilités, nous retenons dans un premier temps la mise en compétition des mutants Ancêtre et Hybride  $\Delta fimB$  avec la souche Émergente dans le tube digestif de la souris. Dans un deuxième temps, nous retenons la réalisation d'un mutant Ancêtre  $\Delta ibeA$ , car ce gène est présent chez la souche Ancêtre mais absent des souches Émergente et Hybride, et code une invasine (*ibeA* pour invasion of the brain endothelium). Situé sur le locus *gimA*, le gène *ibeA* est impliqué dans la pathogénicité de plusieurs pathovars de *E. coli*, en particulier les *E. coli* responsables de méningites chez le nouveau-né, les *E. coli* AIEC impliqués dans les maladies inflammatoires digestives telle que la maladie de Crohn et les APEC<sup>342</sup>. Il jouerait un rôle dans la résistance au stress oxydatif, la survie dans les macrophages et l'adhésion cellulaire via la modulation de la synthèse de fimbriae de type 1<sup>343-346</sup>. L'objectif serait de mettre en compétition un mutant Ancêtre  $\Delta ibeA$  et Ancêtre  $\Delta fimB \Delta ibeA$  avec la souche Émergente et la souche Hybride  $\Delta fimB$  dans le modèle murin de colonisation intestinale. De ces expériences peuvent être attendus des résultats quant à l'impact de ces deux gènes sur la plus grande capacité à coloniser le tube digestif de la souris de la souche Ancêtre. Il serait intéressant dans un troisième temps de tester ces souches en compétition dans le modèle murin de septicémie.

Bien sûr d'autres facteurs que ceux profilés dans ce chapitre et ceux explorés dans nos travaux sont dignes d'intérêt, notamment des facteurs métaboliques qui sont requis pour le maintien à long terme d'une bactérie au sein de la flore intestinale<sup>347</sup>. Mais c'est un vaste sujet dont nous laissons à d'autres le soin de faire l'analyse.

<sup>342</sup> T. Homeier *et al.*, PloS One, **5**: e10877, 2010.

<sup>343</sup> U. Frömmel *et al.*, Applied and Environmental Microbiology, **79**: 5814–5829, 2013.

<sup>344</sup> M. Flécharde *et al.*, Journal of Bacteriology, **194**: 4550–4560, 2012.

<sup>345</sup> M. A. M. Cortes *et al.*, Infection and Immunity, **76**: 4129–4136, 2008.

<sup>346</sup> R. J. Cieza *et al.*, Infection and Immunity, **83**: 1904–1918, 2015.

<sup>347</sup> R. Freter *et al.*, Infection and Immunity, **39**: 686–703, 1983.

# Conclusion

---

La compréhension des éléments responsables du succès mondial du clone *E. coli* ST131 de clade C résistant aux fluoroquinolones et producteur de BLSE est un enjeu majeur de santé publique.

Nos travaux avaient pour but de trouver des raisons à ce succès en opposant le clade C émergent à son progéniteur, le clade B, d'un point de vue essentiellement phénotypique. Nous avons de ce fait mis en évidence une plus grande capacité de production de biofilm précoce des souches du clade B par rapport à celles de clade C, ainsi qu'une plus grande virulence et de plus grandes capacités de colonisation intestinale et urinaire de deux souches de clade B par rapport à une souche de clade C. Nous avons démontré également que, si l'absence d'un gène *fimB* fonctionnel chez les souches de clade C pouvait expliquer en partie les différences de biofilm observées *in vitro*, elle ne pouvait pas, dans les conditions expérimentales utilisées, expliquer la moindre virulence et la moindre capacité de colonisation du clade C observées *in vivo*.

Enfin, tous nos résultats phénotypiques obtenus *in vivo* et l'analyse moléculaire descriptive et quantitative des gènes codant des VFs suggèrent fortement que la perte de virulence serait un mécanisme évolutif du clade C de ST131, lui permettant d'atteindre des niches écologiques nouvelles et de mieux se transmettre que le clade B. Associé à l'acquisition de résistances aux antibiotiques présentant, comme précédemment démontré, un faible coût de fitness, les souches de clade C auraient ainsi un meilleur fitness global que les souches de clade B, notamment dans des environnements sous pression antibiotique.

# Références

---

- [1] P. H. A. Sneath and R. R. Sokal. Numerical taxonomy. *Nature*, **193**: 855–860, 1962. DOI: [10 . 1038/193855a0](https://doi.org/10.1038/193855a0) (cf p. 2)
- [2] D. J. Brenner, G. R. Fanning, F. J. Skerman, and S. Falkow. Polynucleotide sequence divergence among strains of *Escherichia coli* and closely related organisms. *Journal of Bacteriology*, **109**: 953–965, 1972. (cf p. 2)
- [3] R. K. Selander, D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser, M. N. Gilmour, and T. S. Whittam. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Applied and Environmental Microbiology*, **51**: 873–884, 1986. (cf pp. 2, 3)
- [4] P. Desjardins, B. Picard, B. Kaltenböck, J. Elion, and E. Denamur. Sex in *Escherichia coli* does not disrupt the clonal structure of the population: evidence from random amplified polymorphic DNA and restriction-fragment-length polymorphism. *Journal of Molecular Evolution*, **41**: 440–448, 1995. (cf p. 2)
- [5] T. Wirth, D. Falush, R. Lan, *et al.* Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, **60**: 1136–1151, 2006. DOI: [10 . 1111 / j . 1365 - 2958 . 2006 . 05172 . x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x) (cf pp. 2, 3, 5, 13)
- [6] A. Castellani and A. J. Chambers. *Manual of tropical medicine*. New York : William Wood, 1919. (cf p. 2)
- [7] F. Kauffmann. The serology of the coli group. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **57**: 71–100, 1947. (cf p. 2)
- [8] F. Orskov and I. Orskov. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Canadian Journal of Microbiology*, **38**: 699–704, 1992. (cf p. 2)
- [9] O. Tenaillon, D. Skurnik, B. Picard, and E. Denamur. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, **8**: 207–217, 2010. DOI: [10 . 1038 / nrmicro2298](https://doi.org/10.1038/nrmicro2298) (cf pp. 3, 7, 66, 169)
- [10] H. Ochman and R. K. Selander. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *Journal of Bacteriology*, **157**: 690–693, 1984. (cf p. 3)
- [11] R. K. Selander, J. M. Musser, D. A. Caugant, M. N. Gilmour, and T. S. Whittam. Population genetics of pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, **3**: 1–7, 1987. DOI: [10 . 1016 / 0882 - 4010 \(87\) 90032 - 5](https://doi.org/10.1016/0882-4010(87)90032-5) (cf p. 3)
- [12] O. Clermont, M. Olier, C. Hoede, *et al.* Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, **11**: 654–662, 2011. DOI: [10 . 1016 / j . meegid . 2011 . 02 . 005](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.005) (cf p. 3)

- [13] M. Touchon, C. Hoede, O. Tenaillon, *et al.* Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genetics*, **5**: e1000344, 2009. DOI: [10.1371/journal.pgen.1000344](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000344) (cf pp. 3, 8)
- [14] B. Vangchhia, S. Abraham, J. M. Bell, *et al.* Phylogenetic diversity, antimicrobial susceptibility and virulence characteristics of phylogroup F *Escherichia coli* in Australia. *Microbiology (Reading, England)*, **162**: 1904–1912, 2016. DOI: [10.1099/mic.0.000367](https://doi.org/10.1099/mic.0.000367) (cf p. 3)
- [15] O. Clermont, O. V. A. Dixit, B. Vangchhia, *et al.* Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental Microbiology*, **21**: 3107–3117, 2019. DOI: [10.1111/1462-2920.14713](https://doi.org/10.1111/1462-2920.14713) (cf p. 3)
- [16] J. Beghain, A. Bridier-Nahmias, H. Le Nagard, E. Denamur, and O. Clermont. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate *in silico* method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microbial Genomics*, **4**: 2018. DOI: [10.1099/mgen.0.000192](https://doi.org/10.1099/mgen.0.000192) (cf pp. 3, 4)
- [17] O. Clermont, J. K. Christenson, E. Denamur, and D. M. Gordon. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environmental microbiology reports*, **5**: 58–65, 2013. DOI: [10.1111/1758-2229.12019](https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019) (cf p. 4)
- [18] D. M. Gordon, O. Clermont, H. Tolley, and E. Denamur. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environmental Microbiology*, **10**: 2484–2496, 2008. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2008.01669.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01669.x) (cf p. 4)
- [19] B. Picard, J. S. G., S. Gouriou, *et al.* The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and Immunity*, **67**: 546–553, 1999. (cf pp. 4, 5)
- [20] P. Escobar-Páramo, O. Clermont, A.-B. Blanc-Potard, H. Bui, C. Le Bouguéneq, and E. Denamur. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*, **21**: 1085–1094, 2004. DOI: [10.1093/molbev/msh118](https://doi.org/10.1093/molbev/msh118) (cf p. 4)
- [21] T. Le Gall, O. Clermont, S. Gouriou, *et al.* Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 2373–2384, 2007. DOI: [10.1093/molbev/msm172](https://doi.org/10.1093/molbev/msm172) (cf pp. 5, 6, 8)
- [22] M.-H. Nicolas-Chanoine, X. Bertrand, and J.-Y. Madec. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clinical Microbiology Reviews*, **27**: 543–574, 2014. DOI: [10.1128/CMR.00125-13](https://doi.org/10.1128/CMR.00125-13) (cf pp. 5, 12, 22, 25, 29–31, 35, 36, 53)
- [23] J. Penders, C. Thijs, C. Vink, *et al.* Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, **118**: 511–521, 2006. DOI: [10.1542/peds.2005-2824](https://doi.org/10.1542/peds.2005-2824) (cf p. 7)
- [24] D. M. Gordon and A. Cowling. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology (Reading, England)*, **149**: 3575–3586, 2003. DOI: [10.1099/mic.0.26486-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.26486-0) (cf p. 7)
- [25] L. K. Poulsen, F. Lan, C. S. Kristensen, P. Hobolth, S. Molin, and K. A. Krogfelt. Spatial distribution of *Escherichia coli* in the mouse large intestine inferred from rRNA *in situ* hybridization. *Infection and Immunity*, **62**: 5191–5194, 1994. (cf p. 7)



- [26] Heavey, P. M. and Rowland, I.R. The gut microflora of the developing infant: microbiology and metabolism. *Microbial Ecology in Health and Disease*, **11**: 75–83, 1999. DOI: [10.1080/089106099435808](https://doi.org/10.1080/089106099435808) (cf p. 7)
- [27] J. Penders, C. Vink, C. Driessen, N. London, C. Thijs, and E. E. Stobberingh. Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. *FEMS Microbiology Letters*, **243**: 141–147, 2005. DOI: [10.1016/j.femsle.2004.11.052](https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.11.052) (cf p. 7)
- [28] S. Hudault, J. Guignot, and A. L. Servin. *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut*, **49**: 47–55, 2001. DOI: [10.1136/gut.49.1.47](https://doi.org/10.1136/gut.49.1.47) (cf p. 8)
- [29] T. Conway, K. A. Krogfelt, and P. S. Cohen. The life of commensal *Escherichia coli* in the mammalian intestine. *EcoSal Plus*, **1**: 2004. DOI: [10.1128/ecosalplus.8.3.1.2](https://doi.org/10.1128/ecosalplus.8.3.1.2) (cf p. 8)
- [30] M. Diard, L. Garry, M. Selva, T. Mosser, E. Denamur, and I. Matic. Pathogenicity-associated islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* are fitness elements involved in intestinal colonization. *Journal of Bacteriology*, **192**: 4885–4893, 2010. DOI: [10.1128/JB.00804-10](https://doi.org/10.1128/JB.00804-10) (cf pp. 8, 53, 163, 166)
- [31] J. B. Kaper, J. P. Nataro, and H. L. T. Mobley. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, **2**: 123, 2004. DOI: [10.1038/nrmicro818](https://doi.org/10.1038/nrmicro818) (cf pp. 8–10, 64, 65)
- [32] M. A. Croxen, R. J. Law, R. Scholz, K. M. Keeney, M. Wlodarska, and B. B. Finlay. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, **26**: 822–880, 2013. DOI: [10.1128/CMR.00022-13](https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13) (cf p. 8)
- [33] I. C. A. Scaletsky, S. H. Fabbricotti, R. L. B. Carvalho, *et al.* Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**: 645–648, 2002. DOI: [10.1128/JCM.40.2.645-648.2002](https://doi.org/10.1128/JCM.40.2.645-648.2002) (cf p. 9)
- [34] E. Barrios-Villa, G. Cortés-Cortés, P. Lozano-Zaraín, *et al.* Adherent/invasive *Escherichia coli* (AIEC) isolates from asymptomatic people: new *E. coli* ST131 O25:H4/H30-Rx virotypes. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **17**: 42, 2018. DOI: [10.1186/s12941-018-0295-4](https://doi.org/10.1186/s12941-018-0295-4) (cf p. 9)
- [35] A. L. Flores-Mireles, J. N. Walker, M. Caparon, and S. J. Hultgren. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews. Microbiology*, **13**: 269–284, 2015. DOI: [10.1038/nrmicro3432](https://doi.org/10.1038/nrmicro3432) (cf pp. 9, 64, 65, 165)
- [36] S. Y. Tartof, O. D. Solberg, A. R. Manges, and L. W. Riley. Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**: 5860–5864, 2005. DOI: [10.1128/JCM.43.12.5860-5864.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.12.5860-5864.2005) (cf p. 10)
- [37] R. Banerjee, B. Johnston, C. Lohse, *et al.* The clonal distribution and diversity of extraintestinal *Escherichia coli* isolates vary according to patient characteristics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**: 5912–5917, 2013. DOI: [10.1128/AAC.01065-13](https://doi.org/10.1128/AAC.01065-13) (cf pp. 10, 169)
- [38] M. Doumith, M. Day, H. Ciesielczuk, *et al.* Rapid identification of major *Escherichia coli* sequence types causing urinary tract and bloodstream infections. *Journal of Clinical Microbiology*, **53**: 160–166, 2015. DOI: [10.1128/JCM.02562-14](https://doi.org/10.1128/JCM.02562-14) (cf p. 10)
- [39] B. Olesen, F. Scheutz, R. L. Andersen, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* O78:H10, the cause of an outbreak of urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*, **50**: 3703–3711, 2012. DOI: [10.1128/JCM.01909-12](https://doi.org/10.1128/JCM.01909-12) (cf p. 10)

- [40] T. M. Gibreel, A. R. Dodgson, J. Cheesbrough, A. J. Fox, F. J. Bolton, and M. Upton. Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **67**: 346–356, 2012. DOI: [10.1093/jac/dkr451](https://doi.org/10.1093/jac/dkr451) (cf p. 10)
- [41] J. Gaschignard, C. Levy, O. Romain, *et al.* Neonatal bacterial meningitis: 444 cases in 7 years. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, **30**: 212–217, 2011. (cf p. 10)
- [42] R. Basmaci, S. Bonacorsi, P. Bidet, *et al.* *Escherichia coli* meningitis features in 325 children from 2001 to 2013 in France. *Clinical Infectious Diseases*, **61**: 779–786, 2015. DOI: [10.1093/cid/civ367](https://doi.org/10.1093/cid/civ367) (cf p. 10)
- [43] J. Vila, E. Sáez-López, J. R. Johnson, *et al.* *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS microbiology reviews*, **40**: 437–463, 2016. DOI: [10.1093/femsre/fuw005](https://doi.org/10.1093/femsre/fuw005) (cf p. 11)
- [44] M. Kosek, C. Bern, and R. L. Guerrant. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bulletin of the World Health Organization*, **81**: 197–204, 2003. (cf p. 11)
- [45] T. A. Russo and J. R. Johnson. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection*, **5**: 449–456, 2003. DOI: [10.1016/S1286-4579\(03\)00049-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00049-2) (cf p. 11)
- [46] M. E. Terlizzi, G. Gribaudo, and M. E. Maffei. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Frontiers in Microbiology*, **8**: 1566, 2017. DOI: [10.3389/fmicb.2017.01566](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01566) (cf p. 11)
- [47] L. Poirel, J.-Y. Madec, A. Lupo, *et al.* Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, **6**: 2018. DOI: [10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017) (cf p. 11)
- [48] G. A. Jacoby, J. Strahilevitz, and D. C. Hooper. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiology Spectrum*, **2**: 2014. DOI: [10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013) (cf p. 11)
- [49] *Antimicrobial resistance: global report on surveillance* Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2014 (cf p. 11)
- [50] D. M. Livermore and N. Woodford. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology*, **14**: 413–420, 2006. DOI: [10.1016/j.tim.2006.07.008](https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.07.008) (cf p. 11)
- [51] V. Leflon-Guibout, C. Jurand, S. Bonacorsi, *et al.* Emergence and spread of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**: 3736–3742, 2004. DOI: [10.1128/AAC.48.10.3736-3742.2004](https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3736-3742.2004) (cf p. 13)
- [52] N. Kassis-Chikhani, S. Vimont, K. Asselat, *et al.* CTX-M  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in long-term care facilities, France. *Emerging Infectious Diseases*, **10**: 1697–1698, 2004. DOI: [10.3201/eid1009.030969](https://doi.org/10.3201/eid1009.030969) (cf p. 13)
- [53] J. D. D. Pitout, K. B. Laupland, D. L. Church, M. L. Menard, and J. R. Johnson. Virulence factors of *Escherichia coli* isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**: 4667–4670, 2005. DOI: [10.1128/AAC.49.11.4667-4670.2005](https://doi.org/10.1128/AAC.49.11.4667-4670.2005) (cf p. 13)

- [54] A. R. Manges, J. R. Johnson, B. Foxman, T. T. O'Bryan, K. E. Fullerton, and L. W. Riley. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *The New England Journal of Medicine*, **345**: 1007–1013, 2001. DOI: [10.1056/NEJMoa011265](https://doi.org/10.1056/NEJMoa011265) (cf p. 13)
- [55] J. R. Johnson, A. C. Murray, M. A. Kuskowski, *et al.* Distribution and characteristics of *Escherichia coli* clonal group A. *Emerging Infectious Diseases*, **11**: 141–145, 2005. DOI: [10.3201/eid1101.040418](https://doi.org/10.3201/eid1101.040418) (cf p. 13)
- [56] M.-H. Nicolas-Chanoine, J. Blanco, V. Leflon-Guibout, *et al.* Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **61**: 273–281, 2008. DOI: [10.1093/jac/dkm464](https://doi.org/10.1093/jac/dkm464) (cf pp. 13, 15)
- [57] T. M. Coque, A. Novais, A. Carattoli, *et al.* Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerging infectious diseases*, **14**: 195–200, 2008. DOI: [10.3201/eid1402.070350](https://doi.org/10.3201/eid1402.070350) (cf p. 14)
- [58] O. Clermont, M. Lavollay, S. Vimont, *et al.* The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **61**: 1024–1028, 2008. DOI: [10.1093/jac/dkn084](https://doi.org/10.1093/jac/dkn084) (cf pp. 14, 15, 54, 61, 163)
- [59] J. L. Platell, R. N. Cobbold, J. R. Johnson, *et al.* Commonality among fluoroquinolone-resistant sequence type ST131 extraintestinal *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in Australia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**: 3782–3787, 2011. DOI: [10.1128/AAC.00306-11](https://doi.org/10.1128/AAC.00306-11) (cf pp. 15, 40)
- [60] T. Kudinha, J. R. Johnson, S. D. Andrew, F. Kong, P. Anderson, and G. L. Gilbert. Distribution of phylogenetic groups, sequence type ST131, and virulence-associated traits among *Escherichia coli* isolates from men with pyelonephritis or cystitis and healthy controls. *Clinical Microbiology and Infection*, **19**: E173–E180, 2013. DOI: [10.1111/1469-0691.12123](https://doi.org/10.1111/1469-0691.12123) (cf pp. 15, 38)
- [61] Y. Matsumura, M. Yamamoto, M. Nagao, *et al.* Emergence and spread of B2-ST131-O25b, B2-ST131-O16 and D-ST405 clonal groups among extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **67**: 2612–2620, 2012. DOI: [10.1093/jac/dks278](https://doi.org/10.1093/jac/dks278) (cf pp. 15, 38)
- [62] Y. Matsumura, M. Yamamoto, M. Nagao, Y. Ito, S. Takakura, and S. Ichiyama. Association of fluoroquinolone resistance, virulence genes, and IncF plasmids with extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) and ST405 clonal groups. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**: 4736–4742, 2013. DOI: [10.1128/AAC.00641-13](https://doi.org/10.1128/AAC.00641-13) (cf pp. 15, 22)
- [63] G. Dahbi, A. Mora, C. López, *et al.* Emergence of new variants of ST131 clonal group among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **42**: 347–351, 2013. DOI: [10.1016/j.ijantimicag.2013.06.017](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.06.017) (cf p. 15)
- [64] V. Blanc, V. Leflon-Guibout, J. Blanco, *et al.* Prevalence of day-care centre children (France) with faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* comprising O25b:H4 and O16:H5 ST131 strains. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **69**: 1231–1237, 2014. DOI: [10.1093/jac/dkt519](https://doi.org/10.1093/jac/dkt519) (cf pp. 15, 21, 33, 34, 38)

- [65] S. Suzuki, N. Shibata, K. Yamane, J.-i. Wachino, K. Ito, and Y. Arakawa. Change in the prevalence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **63**: 72–79, 2009. DOI: [10.1093/jac/dkn463](https://doi.org/10.1093/jac/dkn463) (cf p. 15)
- [66] F. Jauregui, L. Landraud, V. Passet, *et al.* Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics*, **9**: 560, 2008. DOI: [10.1186/1471-2164-9-560](https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-560) (cf p. 15)
- [67] J. R. Johnson, M.-H. Nicolas-Chanoine, C. DebRoy, *et al.* Comparison of *Escherichia coli* ST131 pulsotypes, by epidemiologic traits, 1967–2009. *Emerging Infectious Diseases*, **18**: 598–607, 2012. DOI: [10.3201/eid1804.111627](https://doi.org/10.3201/eid1804.111627) (cf pp. 15, 40, 42, 45)
- [68] R. C. S. Dias, B. M. Moreira, and L. W. Riley. Use of *fimH* single-nucleotide polymorphisms for strain typing of clinical isolates of *Escherichia coli* for epidemiologic investigation. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**: 483–488, 2010. DOI: [10.1128/JCM.01858-09](https://doi.org/10.1128/JCM.01858-09) (cf p. 15)
- [69] S. N. Abraham, D. Sun, J. B. Dale, and E. H. Beachey. Conservation of the D-mannose-adhesion protein among type 1 fimbriated members of the family Enterobacteriaceae. *Nature*, **336**: 682, 1988. DOI: [10.1038/336682a0](https://doi.org/10.1038/336682a0) (cf p. 15)
- [70] E. V. Sokurenko, M. Feldgarden, E. Trintchina, *et al.* Selection footprint in the FimH adhesin shows pathoadaptive niche differentiation in *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*, **21**: 1373–1383, 2004. DOI: [10.1093/molbev/msh136](https://doi.org/10.1093/molbev/msh136) (cf p. 15)
- [71] S. J. Weissman, J. R. Johnson, V. Tchesnokova, *et al.* High-resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**: 1353–1360, 2012. DOI: [10.1128/AEM.06663-11](https://doi.org/10.1128/AEM.06663-11) (cf p. 15)
- [72] S. Adams-Sapper, B. A. Diep, F. Perdreau-Remington, and L. W. Riley. Clonal composition and community clustering of drug-susceptible and -resistant *Escherichia coli* isolates from bloodstream infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**: 490–497, 2013. DOI: [10.1128/AAC.01025-12](https://doi.org/10.1128/AAC.01025-12) (cf p. 15)
- [73] J. R. Johnson, V. Tchesnokova, B. Johnston, *et al.* Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases*, **207**: 919–928, 2013. DOI: [10.1093/infdis/jis933](https://doi.org/10.1093/infdis/jis933) (cf pp. 15–17, 38)
- [74] J. R. Johnson, M. Menard, B. Johnston, M. A. Kuskowski, K. Nichol, and G. G. Zhanel. Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**: 2733–2739, 2009. DOI: [10.1128/AAC.00297-09](https://doi.org/10.1128/AAC.00297-09) (cf p. 16)
- [75] V. Leflon-Guibout, J. Blanco, K. Amaqdouf, A. Mora, L. Guize, and M.-H. Nicolas-Chanoine. Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, among fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area of Paris, France. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**: 3900–3905, 2008. DOI: [10.1128/JCM.00734-08](https://doi.org/10.1128/JCM.00734-08) (cf pp. 16, 17, 32, 33)
- [76] L. B. Price, J. R. Johnson, M. Aziz, *et al.* The epidemic of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *mBio*, **4**: 2013. DOI: [10.1128/mBio.00377-13](https://doi.org/10.1128/mBio.00377-13) (cf pp. 18, 19, 46)
- [77] N. K. Petty, N. L. Ben Zakour, M. Stanton-Cook, *et al.* Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**: 5694–5699, 2014. DOI: [10.1073/pnas.1322678111](https://doi.org/10.1073/pnas.1322678111) (cf p. 18)

- [78] N. L. Ben Zakour, A. S. Alsheikh-Hussain, M. M. Ashcroft, *et al.* Sequential acquisition of virulence and fluoroquinolone resistance has shaped the evolution of *Escherichia coli* ST131. *mBio*, **7**: 2016. DOI: [10.1128/mBio.00347-16](https://doi.org/10.1128/mBio.00347-16) (cf pp. 18, 19, 21, 46, 53, 61, 162)
- [79] M. Totsika, S. A. Beatson, S. Sarkar, *et al.* Insights into a multidrug resistant *Escherichia coli* pathogen of the globally disseminated ST131 lineage: genome analysis and virulence mechanisms. *PLOS ONE*, **6**: e26578, 2011. DOI: [10.1371/journal.pone.0026578](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026578) (cf pp. 18, 20, 61, 66, 166)
- [80] T. J. Johnson, J. L. Danzeisen, B. Youmans, *et al.* Separate F-type plasmids have shaped the evolution of the H30 subclone of *Escherichia coli* sequence type 131. *mSphere*, **1**: 2016. DOI: [10.1128/mSphere.00121-16](https://doi.org/10.1128/mSphere.00121-16) (cf pp. 20, 23–25, 50)
- [81] Y. Matsumura, J. D. D. Pitout, G. Peirano, *et al.* Rapid identification of different *Escherichia coli* sequence type 131 clades. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **61**: 2017. DOI: [10.1128/AAC.00179-17](https://doi.org/10.1128/AAC.00179-17) (cf pp. 20, 38)
- [82] Y. Matsumura, J. D. D. Pitout, R. Gomi, *et al.* Global *Escherichia coli* sequence type 131 clade with *bla*<sub>CTX-M-27</sub> gene. *Emerging Infectious Diseases*, **22**: 1900–1907, 2016. DOI: [10.3201/eid2211.160519](https://doi.org/10.3201/eid2211.160519) (cf pp. 21, 38)
- [83] R. Gomi, T. Matsuda, Y. Matsumura, *et al.* Occurrence of clinically important lineages, including the sequence type 131 C1-M27 subclone, among extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in wastewater. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **61**: 2017. DOI: [10.1128/AAC.00564-17](https://doi.org/10.1128/AAC.00564-17) (cf pp. 21, 45)
- [84] S. Sghaier, M. S. Abbassi, A. Pascual, *et al.* Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae from animal origin and wastewater in Tunisia: first detection of O25b-B23-CTX-M-27-ST131 *Escherichia coli* and CTX-M-15/OXA-204-producing *Citrobacter freundii* from wastewater. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **17**: 189–194, 2019. DOI: [10.1016/j.jgar.2019.01.002](https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.01.002) (cf p. 21)
- [85] M. Sauget, P. Cholley, A. Vannier, *et al.* Trends of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131 and its H30 subclone in a French hospital over a 15-year period. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **48**: 744–747, 2016. DOI: [10.1016/j.ijantimicag.2016.09.023](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.023) (cf pp. 21, 30, 47)
- [86] H. Ghosh, S. Doijad, L. Falgenhauer, M. Fritzenwanker, C. Imirzalioglu, and T. Chakraborty. *bla*<sub>CTX-M-27</sub>-encoding *Escherichia coli* sequence type 131 lineage C1-M27 clone in clinical isolates, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, **23**: 1754–1756, 2017. DOI: [10.3201/eid2310.170938](https://doi.org/10.3201/eid2310.170938) (cf pp. 21, 38)
- [87] L. Micenková, P. Šišková, J. Bosák, I. Jamborová, L. Cernohorská, and D. Smajs. Characterization of human uropathogenic ESBL-producing *Escherichia coli* in the Czech Republic: spread of CTX-M-27-producing strains in a university hospital. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **20**: 610–617, 2014. DOI: [10.1089/mdr.2014.0013](https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0013) (cf pp. 21, 26, 38)
- [88] A. Birgy, P. Bidet, C. Levy, E. Sobral, R. Cohen, and S. Bonacorsi. CTX-M-27-producing *Escherichia coli* of sequence type 131 and clade C1-M27, France. *Emerging Infectious Diseases*, **23**: 885, 2017. DOI: [10.3201/eid2305.161865](https://doi.org/10.3201/eid2305.161865) (cf pp. 21, 38)
- [89] I. Merino, M. Hernández-García, M.-C. Turrientes, *et al.* Emergence of ESBL-producing *Escherichia coli* ST131-C1-M27 clade colonizing patients in Europe. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **73**: 2973–2980, 2018. DOI: [10.1093/jac/dky296](https://doi.org/10.1093/jac/dky296) (cf pp. 21, 38)

- [90] C. Rodrigues, E. Machado, S. Fernandes, L. Peixe, and Novais. An update on faecal carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae by Portuguese healthy humans: detection of the H30 subclone of B2-ST131 *Escherichia coli* producing CTX-M-27. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **71**: 1120–1122, 2016. DOI: [10.1093/jac/dkv443](https://doi.org/10.1093/jac/dkv443) (cf p. 21)
- [91] A. Birgy, C. Levy, M.-H. Nicolas-Chanoine, *et al.* Independent host factors and bacterial genetic determinants of the emergence and dominance of *Escherichia coli* sequence type 131 CTX-M-27 in a community pediatric cohort study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **63**: 2019. DOI: [10.1128/AAC.00382-19](https://doi.org/10.1128/AAC.00382-19) (cf pp. 21, 38)
- [92] L. C. Melo, M. Haenni, E. Saras, M. Duprilot, M.-H. Nicolas-Chanoine, and J.-Y. Madec. Emergence of the C1-M27 cluster in ST131 *Escherichia coli* from companion animals in France. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2019. DOI: [10.1093/jac/dkz304](https://doi.org/10.1093/jac/dkz304) (cf pp. 21, 38, 40)
- [93] N. Stoesser, A. E. Sheppard, L. Pankhurst, *et al.* Evolutionary history of the global emergence of the *Escherichia coli* epidemic clone ST131. *mBio*, **7**: e02162, 2016. DOI: [10.1128/mBio.02162-15](https://doi.org/10.1128/mBio.02162-15) (cf pp. 21–26, 37, 38, 47)
- [94] A. Carattoli, A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K. L. Hopkins, and E. J. Threlfall. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, **63**: 219–228, 2005. DOI: [10.1016/j.jmimet.2005.03.018](https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2005.03.018) (cf p. 22)
- [95] A. García-Fernández, D. Fortini, K. Veldman, D. Mevius, and A. Carattoli. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **63**: 274–281, 2008. DOI: [10.1093/jac/dkn470](https://doi.org/10.1093/jac/dkn470) (cf p. 22)
- [96] V. F. Lanza, M. de Toro, M. P. Garcillán-Barcia, *et al.* Plasmid flux in *Escherichia coli* ST131 sublineages, analyzed by plasmid constellation network (PLACNET), a new method for plasmid reconstruction from whole genome sequences. *PLoS genetics*, **10**: e1004766, 2014. DOI: [10.1371/journal.pgen.1004766](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004766) (cf pp. 22, 26)
- [97] N. Woodford, A. Carattoli, E. Karisik, A. Underwood, M. J. Ellington, and D. M. Livermore. Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**: 4472–4482, 2009. DOI: [10.1128/AAC.00688-09](https://doi.org/10.1128/AAC.00688-09) (cf pp. 23, 25)
- [98] S. He, A. B. Hickman, A. M. Varani, *et al.* Insertion sequence IS26 reorganizes plasmids in clinically isolated multidrug-resistant bacteria by replicative transposition. *mBio*, **6**: e00762–15, 2015. DOI: [10.1128/mBio.00762-15](https://doi.org/10.1128/mBio.00762-15) (cf p. 23)
- [99] A. Colpan, B. Johnston, S. Porter, *et al.* *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) subclone H30 as an emergent multidrug-resistant pathogen among US veterans. *Clinical Infectious Diseases*, **57**: 1256–1265, 2013. DOI: [10.1093/cid/cit503](https://doi.org/10.1093/cid/cit503) (cf pp. 25, 31, 33, 53)
- [100] R. Banerjee, B. Johnston, C. Lohse, S. B. Porter, C. Clabots, and J. R. Johnson. *Escherichia coli* sequence type 131 is a dominant, antimicrobial-resistant clonal group associated with healthcare and elderly hosts. *Infection control and hospital epidemiology*, **34**: 361–369, 2013. DOI: [10.1086/669865](https://doi.org/10.1086/669865) (cf pp. 25, 30–33, 169)
- [101] K. Schaufler, T. Semmler, D. J. Pickard, *et al.* Carriage of extended-spectrum beta-lactamase-plasmids does not reduce fitness but enhances virulence in some strains of pandemic *Escherichia coli* lineages. *Frontiers in Microbiology*, **7**: 336, 2016. DOI: [10.3389/fmicb.2016.00336](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00336) (cf pp. 25, 50, 51)

- [102] A. Ranjan, J. Scholz, T. Semmler, *et al.* ESBL-plasmid carriage in *Escherichia coli* enhances in vitro bacterial competition fitness and serum resistance in some strains of pandemic sequence types without overall fitness cost. *Gut Pathogens*, **10**: 24, 2018. DOI: [10 . 1186 / s13099-018-0243-z](https://doi.org/10.1186/s13099-018-0243-z) (cf pp. 25, 50)
- [103] L. Roer, S. Overballe-Petersen, F. Hansen, *et al.* ST131 *fmH22* *Escherichia coli* isolate with a *bla<sub>CMY-2</sub>/IncI1/ST12* plasmid obtained from a patient with bloodstream infection: highly similar to *E. coli* isolates of broiler origin. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **74**: 557–560, 2019. DOI: [10 . 1093/jac/dky484](https://doi.org/10.1093/jac/dky484) (cf p. 25)
- [104] A. Mora, F. J. García-Peña, M. P. Alonso, *et al.* Impact of human-associated *Escherichia coli* clonal groups in Antarctic pinnipeds: presence of ST73, ST95, ST141 and ST131. *Scientific Reports*, **8**: 4678, 2018. DOI: [10 . 1038/s41598-018-22943-0](https://doi.org/10.1038/s41598-018-22943-0) (cf pp. 25, 26, 44)
- [105] N. Stoesser, A. E. Sheppard, G. Peirano, *et al.* Complete sequencing of plasmids containing *bla<sub>OXA-163</sub>* and *bla<sub>OXA-48</sub>* in *Escherichia coli* sequence type 131. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **60**: 6948–6951, 2016. DOI: [10 . 1128/AAC.01130-16](https://doi.org/10.1128/AAC.01130-16) (cf p. 25)
- [106] P. McGann, E. Snesrud, A. C. Ong, *et al.* War wound treatment complications due to transfer of an IncN plasmid harboring *bla<sub>OXA-181</sub>* from *Morganella morganii* to CTX-M-27-producing sequence type 131 *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **59**: 3556–3562, 2015. DOI: [10 . 1128/AAC.04442-14](https://doi.org/10.1128/AAC.04442-14) (cf p. 25)
- [107] L. Chen, H. Hu, K. D. Chavda, *et al.* Complete sequence of a KPC-producing IncN multidrug-resistant plasmid from an epidemic *Escherichia coli* sequence type 131 strain in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58**: 2422–2425, 2014. DOI: [10 . 1128/AAC.02587-13](https://doi.org/10.1128/AAC.02587-13) (cf p. 25)
- [108] M. Budič, M. Rijavec, Z. Petkovšek, and D. Zgur-Bertok. *Escherichia coli* bacteriocins: antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia. *PloS One*, **6**: e28769, 2011. DOI: [10 . 1371/journal.pone.0028769](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028769) (cf p. 26)
- [109] M. Rijavec, M. Budic, P. Mrak, M. Müller-Premru, Z. Podlesek, and D. Zgur-Bertok. Prevalence of ColE1-like plasmids and colicin K production among uropathogenic *Escherichia coli* strains and quantification of inhibitory activity of colicin K. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 1029–1032, 2007. DOI: [10 . 1128/AEM.01780-06](https://doi.org/10.1128/AEM.01780-06) (cf p. 26)
- [110] C. M. Liu, M. Stegger, M. Aziz, *et al.* *Escherichia coli* ST131-H22 as a foodborne uropathogen. *mBio*, **9**: 2018. DOI: [10 . 1128/mBio.00470-18](https://doi.org/10.1128/mBio.00470-18) (cf pp. 26, 41, 42, 168)
- [111] X.-X. Zhang, T. Zhang, and H. H. P. Fang. Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **82**: 397–414, 2009. DOI: [10 . 1007 / s00253 - 008 - 1829 - z](https://doi.org/10.1007/s00253-008-1829-z) (cf p. 27)
- [112] F. Baquero, J.-L. Martínez, and R. Cantón. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, **19**: 260–265, 2008. DOI: [10 . 1016 / j . copbio . 2008 . 05 . 006](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006) (cf p. 27)
- [113] K. Veldman, A. Kant, C. Dierikx, A. van Essen-Zandbergen, B. Wit, and D. Mevius. Enterobacteriaceae resistant to third-generation cephalosporins and quinolones in fresh culinary herbs imported from Southeast Asia. *International Journal of Food Microbiology*, **177**: 72–77, 2014. DOI: [10 . 1016 / j . ijfoodmicro . 2014 . 02 . 014](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.014) (cf p. 27)
- [114] S. N. Seiffert, M. Hilty, V. Perreten, and A. Endimiani. Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health? *Drug Resistance Updates*, **16**: 22–45, 2013. DOI: [10 . 1016 / j . drup . 2012 . 12 . 001](https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.12.001) (cf pp. 27, 28)

- [115] H. Blaak, G. Lynch, R. Italiaander, R. A. Hamidjaja, F. M. Schets, and A. M. d. R. Husman. Multidrug-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch surface water and wastewater. *PLOS ONE*, **10**: e0127752, 2015. DOI: [10 . 1371 / journal . pone . 0127752](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127752) (cf pp. 27, 45)
- [116] G. Peirano, D. B. Gregson, S. Kuhn, O. G. Vanderkooi, D. B. Nobrega, and J. D. D. Pitout. Rates of colonization with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Canadian travellers returning from South Asia: a cross-sectional assessment. *CMAJ open*, **5**: E850–E855, 2017. DOI: [10 . 9778/cmajo . 20170041](https://doi.org/10.9778/cmajo.20170041) (cf p. 27)
- [117] L. Armand-Lefèvre, A. Andremont, and E. Ruppé. Travel and acquisition of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Medecine Et Maladies Infectieuses*, **48**: 431–441, 2018. DOI: [10 . 1016/j . medmal . 2018 . 02 . 005](https://doi.org/10.1016/j.medmal.2018.02.005) (cf p. 27)
- [118] A. Cassini, L. D. Högberg, D. Plachouras, *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. *The Lancet Infectious Diseases*, **19**: 56–66, 2019. DOI: [10 . 1016/S1473-3099 \(18\) 30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4) (cf pp. 28, 36)
- [119] J. R. Johnson, C. Urban, S. J. Weissman, *et al.* Molecular epidemiological analysis of *Escherichia coli* sequence type ST131 (O25:H4) and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> among extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* from the United States, 2000 to 2009. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **56**: 2364–2370, 2012. DOI: [10 . 1128/AAC . 05824-11](https://doi.org/10.1128/AAC.05824-11) (cf p. 29)
- [120] G. Peirano, A. K. van der Bij, D. B. Gregson, and J. D. D. Pitout. Molecular epidemiology over an 11-year period (2000 to 2010) of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in a centralized Canadian region. *Journal of Clinical Microbiology*, **50**: 294–299, 2012. DOI: [10 . 1128/JCM . 06025-11](https://doi.org/10.1128/JCM.06025-11) (cf p. 29)
- [121] D. Karfunkel, Y. Carmeli, I. Chmelnitsky, T. Kotlovsky, and S. Navon-Venezia. The emergence and dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* sequence type 131 causing community-onset bacteremia in Israel. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **32**: 513–521, 2013. DOI: [10 . 1007/s10096-012-1765-9](https://doi.org/10.1007/s10096-012-1765-9) (cf p. 30)
- [122] M. J. Day, M. Doumith, J. Abernethy, *et al.* Population structure of *Escherichia coli* causing bacteraemia in the UK and Ireland between 2001 and 2010. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **71**: 2139–2142, 2016. DOI: [10 . 1093/jac/dkw145](https://doi.org/10.1093/jac/dkw145) (cf p. 30)
- [123] S. Mineau, R. Kozak, M. Kisson, *et al.* Emerging antimicrobial resistance among *Escherichia coli* strains in bloodstream infections in Toronto, 2006-2016: a retrospective cohort study. *CMAJ open*, **6**: E580–E586, 2018. DOI: [10 . 9778/cmajo . 20180039](https://doi.org/10.9778/cmajo.20180039) (cf p. 30)
- [124] N. Begum and S. M. Shamsuzzaman. Emergence of CTX-M-15 producing *Escherichia coli* O25b-ST131 clone in a tertiary care hospital of Bangladesh. *The Malaysian Journal of Pathology*, **38**: 241–249, 2016. (cf pp. 30, 35)
- [125] I. Overdeest, M. Haverkate, J. Veenemans, *et al.* Prolonged colonisation with *Escherichia coli* O25:ST131 versus other extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* in a long-term care facility with high endemic level of rectal colonisation, the Netherlands, 2013 to 2014. *Euro Surveillence: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, **21**: 2016. DOI: [10 . 2807/1560-7917 . ES . 2016 . 21 . 42 . 30376](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.42.30376) (cf pp. 30, 33, 35, 63)



- [126] M. J. Day, K. L. Hopkins, D. Wareham, *et al.* Typing and epidemiological surveillance show that UK bloodstream *Escherichia coli* with extended-spectrum  $\beta$ -lactamases correspond to human gut strains, but not those from dinner. *The Lancet Infectious Diseases*, 2019. (cf pp. 30, 42)
- [127] S. Flament-Simon, V. G. Menéndez, M. Duprilot, *et al.* High prevalence of ST131 subclades C2 and C1-M27 producing CTX-M-15 and CTX-M-27, respectively, among ESBL-producing *Escherichia coli* causing extraintestinal infections in Spain and France during 2015. *ECCMID -Paper Poster #P1204*, 2019. (cf pp. 30, 38)
- [128] J. Lafolie, M.-H. Nicolas-Chanoine, F. Grenouillet, D. Hocquet, and X. Bertrand. Prevalence of *Escherichia coli* sequence type 131 and its H30 subclone among *E. coli* isolates in a French hospital. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **44**: 466–468, 2014. DOI: [10.1016/j.ijantimicag.2014.07.016](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.07.016) (cf p. 30)
- [129] Y. A. Kim, J. J. Kim, H. Kim, and K. Lee. Community-onset extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131 at two Korean community hospitals: The spread of multidrug-resistant *E. coli* to the community via healthcare facilities. *International Journal of Infectious Diseases*, **54**: 39–42, 2017. DOI: [10.1016/j.ijid.2016.11.010](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.11.010) (cf p. 30)
- [130] H.-C. Chung, C.-H. Lai, J.-N. Lin, *et al.* Bacteremia caused by extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type ST131 and non-ST131 clones: comparison of demographic data, clinical features, and mortality. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **56**: 618–622, 2012. DOI: [10.1128/AAC.05753-11](https://doi.org/10.1128/AAC.05753-11) (cf pp. 30, 32)
- [131] I. T. M. A. Overdeest, A. M. C. Bergmans, J. J. Verweij, *et al.* Prevalence of phylogroups and O25/ST131 in susceptible and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates, the Netherlands. *Clinical Microbiology and Infection*, **21**: 570.e1–570.e4, 2015. DOI: [10.1016/j.cmi.2015.02.020](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.020) (cf p. 30)
- [132] S. M. Mendis, S. Vasoo, B. D. Johnston, *et al.* Clinical and molecular correlates of *Escherichia coli* bloodstream infection from two geographically diverse centers in Rochester, Minnesota, and Singapore. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **62**: 2018. DOI: [10.1128/AAC.00937-18](https://doi.org/10.1128/AAC.00937-18) (cf pp. 30, 31)
- [133] T. Kallonen, H. J. Brodrick, S. R. Harris, *et al.* Systematic longitudinal survey of invasive *Escherichia coli* in England demonstrates a stable population structure only transiently disturbed by the emergence of ST131. *Genome Research*, **27**: 1437–1449, 2017. DOI: [10.1101/gr.216606.116](https://doi.org/10.1101/gr.216606.116) (cf pp. 31, 47, 51, 53, 93, 160)
- [134] I. Morales-Barroso, L. López-Cerero, J. Molina, *et al.* Bacteraemia due to non-ESBL-producing *Escherichia coli* O25b:H4 sequence type 131: insights into risk factors, clinical features and outcomes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **49**: 498–502, 2017. DOI: [10.1016/j.ijantimicag.2016.12.013](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.12.013) (cf pp. 31, 32, 47, 161)
- [135] A. R. Manges, P. Thuras, S. Porter, and J. R. Johnson. Self-reported risk factors for having *Escherichia coli* sequence type 131 or its H30 subclone among US veterans with a clinical *E. coli* isolate. *Epidemiology and Infection*, 1–7, 2018. DOI: [10.1017/S0950268818003114](https://doi.org/10.1017/S0950268818003114) (cf pp. 31–33, 40)
- [136] M.-F. Cheng, W.-L. Chen, W.-Y. Hung, *et al.* Emergence of extended spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* O25b-ST131: a major community-acquired uropathogen in infants. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, **34**: 469–475, 2015. DOI: [10.1097/INF.0000000000000623](https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000623) (cf p. 31)

- [137] A. Chmielarczyk, M. Pobiega, J. Wójkowska-Mach, *et al.* Molecular epidemiology, plasmid analysis, virulence, and resistance of *Escherichia coli* isolated from neonatal intensive care units in Poland. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **76**: 542–545, 2013. DOI: [10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.016](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.016) (cf p. 31)
- [138] D. M. Drekonja, M. A. Kuskowski, R. Anway, B. D. Johnston, and J. R. Johnson. The niche for *Escherichia coli* sequence type 131 among veterans: urinary tract abnormalities and long-term care facilities. *Open Forum Infectious Diseases*, **3**: ofw138, 2016. DOI: [10.1093/ofid/ofw138](https://doi.org/10.1093/ofid/ofw138) (cf pp. 31–33, 169)
- [139] M.-H. Nicolas-Chanoine, J. Robert, M. Vigan, *et al.* Different factors associated with CTX-M-producing ST131 and non-ST131 *Escherichia coli* clinical isolates. *PLoS ONE*, **8**: e72191, 2013. DOI: [10.1371/journal.pone.0072191](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072191) (cf p. 32)
- [140] F. Can, O. K. Azap, C. Seref, P. Ispir, H. Arslan, and O. Ergonul. Emerging *Escherichia coli* O25b/ST131 clone predicts treatment failure in urinary tract infections. *Clinical Infectious Diseases*, **60**: 523–527, 2015. DOI: [10.1093/cid/ciu864](https://doi.org/10.1093/cid/ciu864) (cf p. 32)
- [141] L. López-Cerero, M. D. Navarro, M. Bellido, *et al.* *Escherichia coli* belonging to the worldwide emerging epidemic clonal group O25b/ST131: risk factors and clinical implications. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **69**: 809–814, 2014. DOI: [10.1093/jac/dkt405](https://doi.org/10.1093/jac/dkt405) (cf p. 32)
- [142] J. R. Johnson, P. Thuras, B. D. Johnston, *et al.* The pandemic H30 subclone of *Escherichia coli* sequence type 131 is associated with persistent infections and adverse outcomes independent from its multidrug resistance and associations with compromised hosts. *Clinical Infectious Diseases*, **62**: 1529–1536, 2016. DOI: [10.1093/cid/ciw193](https://doi.org/10.1093/cid/ciw193) (cf p. 32)
- [143] V. Tchesnokova, M. Billig, S. Chattopadhyay, *et al.* Predictive diagnostics for *Escherichia coli* infections based on the clonal association of antimicrobial resistance and clinical outcome. *Journal of Clinical Microbiology*, **51**: 2991–2999, 2013. DOI: [10.1128/JCM.00984-13](https://doi.org/10.1128/JCM.00984-13) (cf p. 32)
- [144] M. D. Ismail, I. Ali, S. Hatt, *et al.* Association of *Escherichia coli* ST131 lineage with risk of urinary tract infection recurrence among young women. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **13**: 81–84, 2018. DOI: [10.1016/j.jgar.2017.12.006](https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.12.006) (cf p. 32)
- [145] Y. A. Kim, K. Lee, and J. E. Chung. Risk factors and molecular features of sequence type (ST) 131 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in community-onset female genital tract infections. *BMC infectious diseases*, **18**: 250, 2018. DOI: [10.1186/s12879-018-3168-8](https://doi.org/10.1186/s12879-018-3168-8) (cf p. 32)
- [146] M.-H. Nicolas-Chanoine, C. Gruson, S. Bialek-Davenet, *et al.* 10-Fold increase (2006–11) in the rate of healthy subjects with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* faecal carriage in a Parisian check-up centre. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68**: 562–568, 2012. DOI: [10.1093/jac/dks429](https://doi.org/10.1093/jac/dks429) (cf pp. 32, 33)
- [147] T. Kudinha, J. R. Johnson, S. D. Andrew, F. Kong, P. Anderson, and G. L. Gilbert. *Escherichia coli* sequence type 131 as a prominent cause of antibiotic resistance among urinary *Escherichia coli* isolates from reproductive-age women. *Journal of Clinical Microbiology*, **51**: 3270–3276, 2013. DOI: [10.1128/JCM.01315-13](https://doi.org/10.1128/JCM.01315-13) (cf pp. 32, 61)
- [148] Y.-M. Zhong, W.-E. Liu, X.-H. Liang, Y.-M. Li, Z.-J. Jian, and P. M. Hawkey. Emergence and spread of O16-ST131 and O25b-ST131 clones among faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* in healthy individuals in Hunan province, China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **70**: 2223–2227, 2015. DOI: [10.1093/jac/dkv114](https://doi.org/10.1093/jac/dkv114) (cf pp. 32, 35, 38)

- [149] T. Kudinha, J. Johnson, S. Andrew, F. Kong, P. Anderson, and G. Gilbert. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from children with urinary tract infection and from healthy carriers. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, **32**: 543–548, 2013. DOI: [10.1097/INF.0b013e31828ba3f1](https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31828ba3f1) (cf p. 32)
- [150] M.-H. Nicolas-Chanoine, M. Petitjean, A. Mora, *et al.* The ST131 *Escherichia coli* H22 subclone from human intestinal microbiota: Comparison of genomic and phenotypic traits with those of the globally successful H30 subclone. *BMC microbiology*, **17**: 71, 2017. DOI: [10.1186/s12866-017-0984-8](https://doi.org/10.1186/s12866-017-0984-8) (cf pp. 32, 61, 62, 161)
- [151] V. d. Lastours, D. Chopin, H. Jacquier, *et al.* Prospective cohort study of the relative abundance of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the gut of patients admitted to hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **60**: 6941–6944, 2016. DOI: [10.1128/AAC.01328-16](https://doi.org/10.1128/AAC.01328-16) (cf pp. 33, 47)
- [152] B. Li, J.-Y. Sun, Q.-Z. Liu, L.-Z. Han, X.-H. Huang, and Y.-X. Ni. High prevalence of CTX-M  $\beta$ -lactamases in faecal *Escherichia coli* strains from healthy humans in Fuzhou, China. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **43**: 170–174, 2011. DOI: [10.3109/00365548.2010.538856](https://doi.org/10.3109/00365548.2010.538856) (cf p. 33)
- [153] M. Arvand, V. Moser, and Y. Pfeifer. Prevalence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and spread of the epidemic clonal lineage ST131 in nursing homes in Hesse, Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68**: 2686–2688, 2013. DOI: [10.1093/jac/dkt226](https://doi.org/10.1093/jac/dkt226) (cf p. 33)
- [154] C. Rodrigues, E. Machado, S. Fernandes, L. Peixe, and. Novais. Different *Escherichia coli* B2-ST131 clades (B and C) producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) colonizing residents of Portuguese nursing homes. *Epidemiology & Infection*, **145**: 3303–3306, 2017. DOI: [10.1017/S0950268817002266](https://doi.org/10.1017/S0950268817002266) (cf pp. 33, 35)
- [155] M. T. Nüesch-Inderbinen, H. Abgottspon, K. Zurfluh, H. J. Nüesch, R. Stephan, and H. Hächler. Cross-sectional study on fecal carriage of Enterobacteriaceae with resistance to extended-spectrum cephalosporins in primary care patients. *Microbial Drug Resistance*, **19**: 362–369, 2013. DOI: [10.1089/mdr.2013.0013](https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0013) (cf p. 33)
- [156] I. Morales Barroso, L. López-Cerero, M. D. Navarro, B. Gutiérrez-Gutiérrez, A. Pascual, and J. Rodríguez-Baño. Intestinal colonization due to *Escherichia coli* ST131: risk factors and prevalence. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, **7**: 135, 2018. DOI: [10.1186/s13756-018-0427-9](https://doi.org/10.1186/s13756-018-0427-9) (cf p. 33)
- [157] P. M. den Reijer, S. van Burgh, A. Burggraaf, J. M. Ossewaarde, and A. van der Zee. The widespread presence of a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST131 clade among community-associated and hospitalized patients. *PLoS ONE*, **11**: e0150420, 2016. DOI: [10.1371/journal.pone.0150420](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150420) (cf p. 33)
- [158] R. Izdebski, A. Baraniak, J. Fielt, *et al.* Clonal structure, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, and acquired AmpC-type cephalosporinases of *Escherichia coli* populations colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**: 309–316, 2013. DOI: [10.1128/AAC.01656-12](https://doi.org/10.1128/AAC.01656-12) (cf p. 33)
- [159] S. B. Jørgensen, A. Søråas, A. Sundsfjord, K. Liestøl, T. M. Leegaard, and P. A. Jenum. Fecal carriage of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* after urinary tract infection – A three year prospective cohort study. *PLOS ONE*, **12**: e0173510, 2017. DOI: [10.1371/journal.pone.0173510](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173510) (cf p. 34)

- [160] E. Titelman, C. M. Hasan, A. Iversen, *et al.* Faecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae is common 12 months after infection and is related to strain factors. *Clinical Microbiology and Infection*, **20**: O508–515, 2014. DOI: [10.1111/1469-0691.12559](https://doi.org/10.1111/1469-0691.12559) (cf p. 34)
- [161] S. Brisse, L. Diancourt, C. Laouénan, *et al.* Phylogenetic distribution of CTX-M- and non-extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates: group B2 isolates, except clone ST131, rarely produce CTX-M enzymes. *Journal of Clinical Microbiology*, **50**: 2974–2981, 2012. DOI: [10.1128/JCM.00919-12](https://doi.org/10.1128/JCM.00919-12) (cf pp. 34, 49, 53)
- [162] V. L. Tchesnokova, E. Rechkina, D. Chan, *et al.* Pandemic uropathogenic fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* have enhanced ability to persist in the gut and cause bacteriuria in healthy women. *Clinical Infectious Diseases*, ciz547, 2019. DOI: [10.1093/cid/ciz547](https://doi.org/10.1093/cid/ciz547) (cf p. 34)
- [163] J. Johnson, J. Anderson, C. Clabots, B. Johnston, and M. Cooperstock. Within-household sharing of a fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* sequence type ST131 strain causing pediatric osteoarticular infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, **29**: 473–475, 2010. DOI: [10.1097/INF.0b013e3181c89bd7](https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181c89bd7) (cf p. 34)
- [164] R. C. Owens, J. R. Johnson, P. Stogsdill, L. Yarmus, K. Lolans, and J. Quinn. Community transmission in the United States of a CTX-M-15-producing sequence type ST131 *Escherichia coli* strain resulting in death. *Journal of Clinical Microbiology*, **49**: 3406–3408, 2011. DOI: [10.1128/JCM.00993-11](https://doi.org/10.1128/JCM.00993-11) (cf p. 34)
- [165] P. T. Ender, D. Gajanana, B. Johnston, C. Clabots, F. J. Tamarkin, and J. R. Johnson. Transmission of an extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* (sequence type ST131) strain between a father and daughter resulting in septic shock and emphysematous pyelonephritis. *Journal of Clinical Microbiology*, **47**: 3780–3782, 2009. DOI: [10.1128/JCM.01361-09](https://doi.org/10.1128/JCM.01361-09) (cf p. 34)
- [166] T. Madigan, J. R. Johnson, C. Clabots, *et al.* Extensive household outbreak of urinary tract infection and intestinal colonization due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131. *Clinical Infectious Diseases*, **61**: e5–12, 2015. DOI: [10.1093/cid/civ273](https://doi.org/10.1093/cid/civ273) (cf p. 34)
- [167] J. R. Johnson, G. Davis, C. Clabots, *et al.* Household clustering of *Escherichia coli* sequence type 131 clinical and fecal isolates according to whole genome sequence analysis. *Open Forum Infectious Diseases*, **3**: ofw129, 2016. DOI: [10.1093/ofid/ofw129](https://doi.org/10.1093/ofid/ofw129) (cf pp. 34, 40)
- [168] M. Hilty, B. Y. Betsch, K. Bögli-Stuber, *et al.* Transmission dynamics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in the tertiary care hospital and the household setting. *Clinical Infectious Diseases*, **55**: 967–975, 2012. DOI: [10.1093/cid/cis581](https://doi.org/10.1093/cid/cis581) (cf p. 35)
- [169] E. Torres, L. López-Cerero, I. Morales, M. D. Navarro, J. Rodríguez-Baño, and A. Pascual. Prevalence and transmission dynamics of *Escherichia coli* ST131 among contacts of infected community and hospitalized patients. *Clinical Microbiology and Infection*, **24**: 618–623, 2018. DOI: [10.1016/j.cmi.2017.09.007](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.09.007) (cf p. 35)
- [170] S. Lietzau, E. Raum, H. von Baum, R. Marre, and H. Brenner. Clustering of antibiotic resistance of *Escherichia coli* in couples: suggestion for a major role of conjugal transmission. *BMC Infectious Diseases*, **6**: 119, 2006. DOI: [10.1186/1471-2334-6-119](https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-119) (cf p. 35)

- [171] S. Lietzau, E. Raum, H. v. Baum, R. Marre, and H. Brenner. Household contacts were key factor for children's colonization with resistant *Escherichia coli* in community setting. *Journal of Clinical Epidemiology*, **60**: 1149–1155, 2007. DOI: [10.1016/j.jclinepi.2007.01.016](https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2007.01.016) (cf p. 35)
- [172] A. Giedraitienė, A. Vitkauskienė, A. Pavilonis, *et al.* Prevalence of O25b-ST131 clone among *Escherichia coli* strains producing CTX-M-15, CTX-M-14 and CTX-M-92  $\beta$ -lactamases. *Infectious Diseases (London, England)*, **49**: 106–112, 2017. DOI: [10.1080/23744235.2016.1221531](https://doi.org/10.1080/23744235.2016.1221531) (cf p. 35)
- [173] H. Kanamori, C. M. Parobek, J. J. Juliano, *et al.* Genomic analysis of multidrug-resistant *Escherichia coli* from North Carolina community hospitals: ongoing circulation of CTX-M-producing ST131-H30Rx and ST131-H30R1 strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **61**: 2017. DOI: [10.1128/AAC.00912-17](https://doi.org/10.1128/AAC.00912-17) (cf p. 35)
- [174] Y. Matsumura, J. R. Johnson, M. Yamamoto, *et al.* CTX-M-27- and CTX-M-14-producing, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* of the H30 subclonal group within ST131 drive a Japanese regional ESBL epidemic. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **70**: 1639–1649, 2015. DOI: [10.1093/jac/dkv017](https://doi.org/10.1093/jac/dkv017) (cf p. 35)
- [175] M. H. Namaei, M. Yousefi, M. Ziaee, *et al.* First report of prevalence of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* O25b/ST131 from Iran. *Microbial Drug Resistance*, **23**: 879–884, 2017. DOI: [10.1089/mdr.2016.0272](https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0272) (cf p. 35)
- [176] K. Kawamura, K. Hayashi, N. Matsuo, *et al.* Prevalence of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* B2-O25-ST131 H30R among residents in nonacute care facilities in Japan. *Microbial Drug Resistance*, **24**: 1513–1520, 2018. DOI: [10.1089/mdr.2018.0068](https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0068) (cf pp. 35, 38)
- [177] C. C. Papagiannitsis, V. Študentová, V. Jakubů, *et al.* High prevalence of ST131 among CTX-M-producing *Escherichia coli* from community-acquired infections, in the Czech Republic. *Microbial Drug Resistance*, **21**: 74–84, 2015. DOI: [10.1089/mdr.2014.0070](https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0070) (cf p. 35)
- [178] S. A. Alsharapy, B. Yanat, L. Lopez-Cerero, *et al.* Prevalence of ST131 clone producing both ESBL CTX-M-15 and AAC(6')Ib-cr among ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates from Yemen. *Microbial Drug Resistance*, 2018. DOI: [10.1089/mdr.2018.0024](https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0024) (cf p. 35)
- [179] M. H. Al-Agamy, A. M. Shibl, M. M. Hafez, M. N. Al-Ahdal, Z. A. Memish, and H. Khubnani. Molecular characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Riyadh: emergence of CTX-M-15-producing *E. coli* ST131. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **13**: 4, 2014. DOI: [10.1186/1476-0711-13-4](https://doi.org/10.1186/1476-0711-13-4) (cf p. 35)
- [180] E. F. Badran, R. A. Qamer Din, and A. A. Shehabi. Low intestinal colonization of *Escherichia coli* clone ST131 producing CTX-M-15 in Jordanian infants. *Journal of Medical Microbiology*, **65**: 137–141, 2016. DOI: [10.1099/jmm.0.000210](https://doi.org/10.1099/jmm.0.000210) (cf p. 35)
- [181] R. Dziri, N. Klibi, C. A. Alonso, *et al.* Detection of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates of lineages ST131-B2 and ST167-A in environmental samples of a Tunisian hospital. *Microbial Drug Resistance*, **22**: 399–403, 2016. DOI: [10.1089/mdr.2015.0354](https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0354) (cf p. 35)
- [182] P. Nordmann and L. Poirel. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, **20**: 821–830, 2014. DOI: [10.1111/1469-0691.12719](https://doi.org/10.1111/1469-0691.12719) (cf p. 36)

- [183] G. Peirano, P. C. Schreckenberger, and J. D. D. Pitout. Characteristics of NDM-1-producing *Escherichia coli* isolates that belong to the successful and virulent clone ST131. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**: 2986–2988, 2011. DOI: [10 . 1128 / AAC . 01763 - 10](https://doi.org/10.1128/AAC.01763-10) (cf p. 36)
- [184] R. A. Bonnin, L. Poirel, A. Carattoli, and P. Nordmann. Characterization of an IncFII plasmid encoding NDM-1 from *Escherichia coli* ST131. *PLOS ONE*, **7**: e34752, 2012. DOI: [10 . 1371 / journal . pone . 0034752](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034752) (cf p. 36)
- [185] L.-H. Wang, P.-P. Liu, D.-D. Wei, *et al.* Clinical isolates of uropathogenic *Escherichia coli* ST131 producing NDM-7 metallo- $\beta$ -lactamase in China. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **48**: 41–45, 2016. DOI: [10 . 1016 / j . ijantimicag . 2016 . 03 . 009](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.03.009) (cf p. 36)
- [186] A. Hussain, A. Ranjan, N. Nandanwar, A. Babbar, S. Jadhav, and N. Ahmed. Genotypic and phenotypic profiles of *Escherichia coli* isolates belonging to clinical sequence type 131 (ST131), clinical non-ST131, and fecal non-ST131 lineages from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58**: 7240–7249, 2014. DOI: [10 . 1128 / AAC . 03320 - 14](https://doi.org/10.1128/AAC.03320-14) (cf pp. 36, 54, 61)
- [187] A. J. Mathers, G. Peirano, and J. D. D. Pitout. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Reviews*, **28**: 565–591, 2015. DOI: [10 . 1128 / CMR . 00116 - 14](https://doi.org/10.1128/CMR.00116-14) (cf p. 36)
- [188] R. Markovska, T. Stoeva, L. Boyanova, *et al.* Isolation of *Escherichia coli* ST131 producing KPC-2 in Bulgaria. *Infectious Diseases (London, England)*, **49**: 429–431, 2017. DOI: [10 . 1080 / 23744235 . 2016 . 1270464](https://doi.org/10.1080/23744235.2016.1270464) (cf p. 36)
- [189] J. C. Cai, R. Zhang, Y. Y. Hu, H. W. Zhou, and G.-X. Chen. Emergence of *Escherichia coli* sequence type 131 isolates producing KPC-2 carbapenemase in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58**: 1146–1152, 2014. DOI: [10 . 1128 / AAC . 00912 - 13](https://doi.org/10.1128/AAC.00912-13) (cf p. 36)
- [190] F. Zhang, D. Zhu, L. Xie, X. Guo, Y. Ni, and J. Sun. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and the prevalence of ST131 subclone H30 in Shanghai, China. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **34**: 1263–1269, 2015. DOI: [10 . 1007 / s10096 - 015 - 2356 - 3](https://doi.org/10.1007/s10096-015-2356-3) (cf p. 36)
- [191] A. Piazza, M. Caltagirone, I. Bitar, *et al.* Emergence of *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) and ST3948 with KPC-2, KPC-3 and KPC-8 carbapenemases from a long-term care and rehabilitation facility (LTCRF) in Northern Italy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **901**: 77–89, 2016. DOI: [10 . 1007 / 5584 \\_ 2015 \\_ 5017](https://doi.org/10.1007/5584_2015_5017) (cf p. 36)
- [192] Z. Hojabri, M. Mirmohammadkhani, F. Kamali, K. Ghassemi, S. Taghavipour, and O. Pajand. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* sequence type 131 and its H30/H30-Rx subclones recovered from extra-intestinal infections: first report of OXA-48 producing ST131 clone from Iran. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **36**: 1859–1866, 2017. DOI: [10 . 1007 / s10096 - 017 - 3021 - 9](https://doi.org/10.1007/s10096-017-3021-9) (cf p. 36)
- [193] J. A. O’Hara, F. Hu, C. Ahn, *et al.* Molecular epidemiology of KPC-producing *Escherichia coli*: occurrence of ST131-*fimH30* subclone harboring pKpQIL-like IncFIIk plasmid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58**: 4234–4237, 2014. DOI: [10 . 1128 / AAC . 02182 - 13](https://doi.org/10.1128/AAC.02182-13) (cf p. 36)
- [194] G. Peirano, P. A. Bradford, K. M. Kazmierczak, *et al.* Global incidence of carbapenemase-producing *Escherichia coli* ST131. *Emerging Infectious Diseases*, **20**: 1928–1931, 2014. DOI: [10 . 3201 / eid2011 . 141388](https://doi.org/10.3201/eid2011.141388) (cf p. 36)

- [195] B. Catry, M. Cavaleri, K. Baptiste, *et al.* Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **46**: 297–306, 2015. DOI: [10.1016/j.ijantimicag.2015.06.005](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.06.005) (cf p. 37)
- [196] Y.-Y. Liu, Y. Wang, T. R. Walsh, *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet. Infectious Diseases*, **16**: 161–168, 2016. DOI: [10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7) (cf p. 37)
- [197] L. Dortet, R. Bonnin, A. Jousset, L. Gauthier, and T. Naas. Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries : une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance ! *Journal des Anti-infectieux*, **18**: 139–159, 2016. DOI: [10.1016/j.antinf.2016.09.003](https://doi.org/10.1016/j.antinf.2016.09.003) (cf p. 37)
- [198] S. Matamoros, J. M. v. Hattem, M. S. Arcilla, *et al.* Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the *mcr-1* gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. *Scientific Reports*, **7**: 15364, 2017. DOI: [10.1038/s41598-017-15539-7](https://doi.org/10.1038/s41598-017-15539-7) (cf p. 37)
- [199] S.-C. Kuo, W.-C. Huang, H.-Y. Wang, Y.-R. Shiau, M.-F. Cheng, and T.-L. Lauderdale. Colistin resistance gene *mcr-1* in *Escherichia coli* isolates from humans and retail meats, Taiwan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **71**: 2327–2329, 2016. DOI: [10.1093/jac/dkw122](https://doi.org/10.1093/jac/dkw122) (cf p. 37)
- [200] V. Ortiz de la Tabla, A. Ortega, F. Buñuel, M. Pérez-Vázquez, B. Marcos, and J. Oteo. Detection of the high-risk clone ST131 of *Escherichia coli* carrying the colistin resistance gene *mcr-1* and causing acute peritonitis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **49**: 115–116, 2017. DOI: [10.1016/j.ijantimicag.2016.10.003](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.10.003) (cf p. 37)
- [201] Y. Wang, G.-B. Tian, R. Zhang, *et al.* Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study. *The Lancet Infectious Diseases*, **17**: 390–399, 2017. DOI: [10.1016/S1473-3099\(16\)30527-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30527-8) (cf p. 37)
- [202] H. Hasman, A. M. Hammerum, F. Hansen, *et al.* Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, **20**: 2015. DOI: [10.2807/1560-7917.ES.2015.20.49.30085](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.49.30085) (cf p. 37)
- [203] L. Roer, F. Hansen, M. Stegger, U. W. Sönksen, H. Hasman, and A. M. Hammerum. Novel *mcr-3* variant, encoding mobile colistin resistance, in an ST131 *Escherichia coli* isolate from bloodstream infection, Denmark, 2014. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, **22**: 2017. DOI: [22846](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2014.19.22.22846) (cf p. 37)
- [204] M. F. Alghoribi, M. Doumith, M. Upton, *et al.* Complete genome sequence of a colistin-resistant uropathogenic *Escherichia coli* sequence type 131 *fimH22* strain harboring *mcr-1* on an IncHI2 plasmid, isolated in Riyadh, Saudi Arabia. *Microbiology Resource Announcements*, **8**: 2019. DOI: [10.1128/MRA.00104-19](https://doi.org/10.1128/MRA.00104-19) (cf p. 37)
- [205] I. García-Meniño, V. García, A. Mora, *et al.* Swine enteric colibacillosis in Spain: pathogenic potential of *mcr-1* ST10 and ST131 *E. coli* isolates. *Frontiers in Microbiology*, **9**: 2659, 2018. DOI: [10.3389/fmicb.2018.02659](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02659) (cf pp. 37, 41)

- [206] D. Faccone, F. A. Moredo, G. I. Giacoboni, *et al.* Multidrug resistant *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and *bla*<sub>CTX-M</sub> isolated from swine in Argentina. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **18**: 160–162, 2019. DOI: [10.1016/j.jgar.2019.03.011](https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.03.011) (cf pp. 37, 41)
- [207] B. Olesen, D. S. Hansen, F. Nilsson, *et al.* Prevalence and characteristics of the epidemic multiresistant *Escherichia coli* ST131 clonal group among extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* isolates in Copenhagen, Denmark. *Journal of Clinical Microbiology*, **51**: 1779–1785, 2013. DOI: [10.1128/JCM.00346-13](https://doi.org/10.1128/JCM.00346-13) (cf pp. 38, 53)
- [208] G. Dahbi, A. Mora, R. Mamani, *et al.* Molecular epidemiology and virulence of *Escherichia coli* O16:H5-ST131: comparison with H30 and H30-Rx subclones of O25b:H4-ST131. *International journal of medical microbiology*, **304**: 1247–1257, 2014. DOI: [10.1016/j.ijmm.2014.10.002](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.10.002) (cf pp. 38, 53, 54)
- [209] M. de Toro, J. Fernández, V. García, *et al.* Whole genome sequencing, molecular typing and *in vivo* virulence of OXA-48-producing *Escherichia coli* isolates including ST131 H30-Rx, H22 and H41 subclones. *Scientific Reports*, **7**: 12103, 2017. DOI: [10.1038/s41598-017-12015-0](https://doi.org/10.1038/s41598-017-12015-0) (cf pp. 38, 163, 165)
- [210] J. D. Pitout and R. DeVinney. *Escherichia coli* ST131: a multidrug-resistant clone primed for global domination. *F1000Research*, **6**: 195, 2017. DOI: [10.12688/f1000research.10609.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.10609.1) (cf p. 38)
- [211] Y. Komatsu, K. Kasahara, T. Inoue, *et al.* Molecular epidemiology and clinical features of extended-spectrum beta-lactamase- or carbapenemase-producing *Escherichia coli* bacteremia in Japan. *PLoS ONE*, **13**: e0202276, 2018. DOI: [10.1371/journal.pone.0202276](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202276) (cf p. 38)
- [212] T. A. Hutton, G. K. Innes, J. Harel, *et al.* Phylogroup and virulence gene association with clinical characteristics of *Escherichia coli* urinary tract infections from dogs and cats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **30**: 64–70, 2018. DOI: [10.1177/1040638717729395](https://doi.org/10.1177/1040638717729395) (cf p. 39)
- [213] C. Ewers, M. Grobbel, I. Stamm, *et al.* Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **65**: 651–660, 2010. DOI: [10.1093/jac/dkq004](https://doi.org/10.1093/jac/dkq004) (cf p. 39)
- [214] C. Ewers, A. Bethe, T. Semmler, S. Guenther, and L. H. Wieler. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clinical Microbiology and Infection*, **18**: 646–655, 2012. DOI: [10.1111/j.1469-0691.2012.03850.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03850.x) (cf p. 39)
- [215] J. R. Johnson, B. Johnston, C. R. Clabots, M. A. Kuskowski, E. Roberts, and C. DebRoy. Virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* serogroup O6 isolates from humans, dogs, and cats. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**: 417–422, 2008. DOI: [10.1128/JCM.00674-07](https://doi.org/10.1128/JCM.00674-07) (cf p. 39)
- [216] S. Guo, H. J. M. Brouwers, R. N. Cobbold, *et al.* Fluoroquinolone-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, including O25b-ST131, isolated from faeces of hospitalized dogs in an Australian veterinary referral centre. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68**: 1025–1031, 2013. DOI: [10.1093/jac/dks515](https://doi.org/10.1093/jac/dks515) (cf p. 39)



- [217] X. Liu, K. Thungrat, and D. M. Boothe. Multilocus sequence typing and virulence profiles in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from cats in the United States. *PLOS ONE*, **10**: e0143335, 2015. DOI: [10.1371/journal.pone.0143335](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143335) (cf p. 39)
- [218] J. A. Bourne, W. L. Chong, and D. M. Gordon. Genetic structure, antimicrobial resistance and frequency of human associated *Escherichia coli* sequence types among faecal isolates from healthy dogs and cats living in Canberra, Australia. *PLoS ONE*, **14**: e0212867, 2019. DOI: [10.1371/journal.pone.0212867](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212867) (cf p. 39)
- [219] K. Kawamura, T. Sugawara, N. Matsuo, *et al.* Spread of CTX-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates of epidemic clone B2-O25-ST131 among dogs and cats in Japan. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, **23**: 1059–1066, 2017. DOI: [10.1089/mdr.2016.0246](https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0246) (cf p. 39)
- [220] K. Harada, Y. Nakai, and Y. Kataoka. Mechanisms of resistance to cephalosporin and emergence of O25b-ST131 clone harboring CTX-M-27  $\beta$ -lactamase in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from dogs and cats in Japan. *Microbiology and Immunology*, **56**: 480–485, 2012. DOI: [10.1111/j.1348-0421.2012.00463.x](https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2012.00463.x) (cf p. 39)
- [221] J. L. Platell, R. N. Cobbold, J. R. Johnson, and D. J. Trott. Clonal group distribution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* among humans and companion animals in Australia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **65**: 1936–1938, 2010. DOI: [10.1093/jac/dkq236](https://doi.org/10.1093/jac/dkq236) (cf p. 39)
- [222] A. Belas, C. Marques, C. Aboim, and C. Pomba. Emergence of *Escherichia coli* ST131 H30/H30-Rx subclones in companion animals. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **74**: 266–269, 2019. DOI: [10.1093/jac/dky381](https://doi.org/10.1093/jac/dky381) (cf p. 39)
- [223] A. L. Zogg, K. Zurfluh, S. Schmitt, M. Nüesch-Inderbinnen, and R. Stephan. Antimicrobial resistance, multilocus sequence types and virulence profiles of ESBL producing and non-ESBL producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from cats and dogs in Switzerland. *Veterinary Microbiology*, **216**: 79–84, 2018. DOI: [10.1016/j.vetmic.2018.02.011](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.02.011) (cf p. 39)
- [224] A. Cormier, P. L. C. Zhang, G. Chalmers, *et al.* Diversity of CTX-M-positive *Escherichia coli* recovered from animals in Canada. *Veterinary Microbiology*, **231**: 71–75, 2019. DOI: [10.1016/j.vetmic.2019.02.031](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.02.031) (cf pp. 39, 41)
- [225] J. R. Johnson, S. Miller, B. Johnston, C. Clabots, and C. DebRoy. Sharing of *Escherichia coli* sequence type ST131 and other multidrug-resistant and urovirulent *E. coli* strains among dogs and cats within a household. *Journal of Clinical Microbiology*, **47**: 3721–3725, 2009. DOI: [10.1128/JCM.01581-09](https://doi.org/10.1128/JCM.01581-09) (cf p. 40)
- [226] C. Pomba, L. López-Cerero, M. Bellido, *et al.* Within-lineage variability of ST131 *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in the south of Europe. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **69**: 271–273, 2014. DOI: [10.1093/jac/dkt343](https://doi.org/10.1093/jac/dkt343) (cf p. 40)
- [227] D. Urban, A. Chevance, and G. Moulin. Rapport de l'Anses : Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2017. *Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*, 2018. DOI: <https://www.anses.fr/fr/content/rapport-de-lanses-suivi-des-ventes-de-m%C3%A9dicaments-v%C3%A9t%C3%A9rinaires-contenant-des-antibiotiques-7> (cf p. 41)

- [228] A.-K. Schink, K. Kadlec, H. Kaspar, J. Mankertz, and S. Schwarz. Analysis of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates collected in the GERM-Vet monitoring programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68**: 1741–1749, 2013. DOI: [10.1093/jac/dkt123](https://doi.org/10.1093/jac/dkt123) (cf p. 41)
- [229] A. Mora, A. Herrera, R. Mamani, *et al.* Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**: 6991–6997, 2010. DOI: [10.1128/AEM.01112-10](https://doi.org/10.1128/AEM.01112-10) (cf pp. 41, 42)
- [230] M. Giufrè, C. Graziani, M. Accogli, I. Luzzi, L. Busani, and M. Cerquetti. *Escherichia coli* of human and avian origin: detection of clonal groups associated with fluoroquinolone and multidrug resistance in Italy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **67**: 860–867, 2012. DOI: [10.1093/jac/dkr565](https://doi.org/10.1093/jac/dkr565) (cf p. 41)
- [231] M. Trobos, H. Christensen, M. Sunde, *et al.* Characterization of sulphonamide-resistant *Escherichia coli* using comparison of *sul2* gene sequences and multilocus sequence typing. *Microbiology*, **155**: 831–836, 2009. DOI: [10.1099/mic.0.024190-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.024190-0) (cf p. 41)
- [232] C. Vincent, P. Boerlin, D. Daignault, *et al.* Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerging Infectious Diseases*, **16**: 88–95, 2010. DOI: [10.3201/eid1601.091118](https://doi.org/10.3201/eid1601.091118) (cf p. 42)
- [233] J. Blanco, A. Mora, R. Mamani, *et al.* Four main virotypes among extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: bacterial, epidemiological, and clinical characteristics. *Journal of Clinical Microbiology*, **51**: 3358–3367, 2013. DOI: [10.1128/JCM.01555-13](https://doi.org/10.1128/JCM.01555-13) (cf pp. 42, 53, 54)
- [234] A. Ghodousi, C. Bonura, P. Di Carlo, W. B. van Leeuwen, and C. Mamma. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* sequence type 131 H30-R and H30-Rx subclones in retail chicken meat, Italy. *International Journal of Food Microbiology*, **228**: 10–13, 2016. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.004](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.004) (cf p. 42)
- [235] B. Vangchhia, M. D. J. Blyton, P. Collignon, K. Kennedy, and D. M. Gordon. Factors affecting the presence, genetic diversity and antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli* in poultry meat samples collected from Canberra, Australia. *Environmental Microbiology*, **20**: 1350–1361, 2018. DOI: [10.1111/1462-2920.14030](https://doi.org/10.1111/1462-2920.14030) (cf p. 42)
- [236] H. Dhanji, N. M. Murphy, M. Doumith, *et al.* Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **65**: 2534–2537, 2010. DOI: [10.1093/jac/dkq376](https://doi.org/10.1093/jac/dkq376) (cf p. 42)
- [237] A. Tóth, v. Juhász-Kaszanyitzky, T. Mag, G. Hajbel-Vékony, J. Pászti, and I. Damjanova. Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* strains isolated from animal and human clinical samples in Hungary in 2006–2007. *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica*, **60**: 175–185, 2013. DOI: [10.1556/AMicr.60.2013.2.8](https://doi.org/10.1556/AMicr.60.2013.2.8) (cf p. 42)
- [238] A. R. Manges. *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry-meat. *Clinical Microbiology and Infection*, **22**: 122–129, 2016. DOI: [10.1016/j.cmi.2015.11.010](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.11.010) (cf p. 43)
- [239] J. Hernandez, J. Bonnedahl, I. Eliasson, *et al.* Globally disseminated human pathogenic *Escherichia coli* of O25b-ST131 clone, harbouring *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, found in Glaucous-winged gull at remote Commander Islands, Russia. *Environmental Microbiology Reports*, **2**: 329–332, 2010. DOI: [10.1111/j.1758-2229.2010.00142.x](https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00142.x) (cf p. 44)

- [240] D. Tausova, M. Dolejska, A. Cizek, *et al.* *Escherichia coli* with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in Central Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **67**: 1103–1107, 2012. DOI: [10.1093/jac/dks017](https://doi.org/10.1093/jac/dks017) (cf p. 44)
- [241] R. R. Simões, L. Poirel, P. M. Da Costa, and P. Nordmann. Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, **16**: 110–112, 2010. DOI: [10.3201/eid1601.090896](https://doi.org/10.3201/eid1601.090896) (cf p. 44)
- [242] A. R. Varela, V. Manageiro, E. Ferreira, *et al.* Molecular evidence of the close relatedness of clinical, gull and wastewater isolates of quinolone-resistant *Escherichia coli*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **3**: 286–289, 2015. DOI: [10.1016/j.jgar.2015.07.008](https://doi.org/10.1016/j.jgar.2015.07.008) (cf p. 44)
- [243] I. Jamborova, B. D. Johnston, I. Papousek, *et al.* Extensive genetic commonality among wildlife, wastewater, community, and nosocomial isolates of *Escherichia coli* sequence type 131 (*H30R1* and *H30Rx* Subclones) that carry *bla*<sub>CTX-M-27</sub> or *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **62**: 2018. DOI: [10.1128/AAC.00519-18](https://doi.org/10.1128/AAC.00519-18) (cf pp. 44, 45)
- [244] S. Guenther, M. Grobbel, J. Beutlich, *et al.* Detection of pandemic B2-O25-ST131 *Escherichia coli* harbouring the CTX-M-9 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase type in a feral urban brown rat (*Rattus norvegicus*). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **65**: 582–584, 2010. DOI: [10.1093/jac/dkp496](https://doi.org/10.1093/jac/dkp496) (cf p. 44)
- [245] S. Mukerji, M. Stegger, A. V. Truswell, *et al.* Resistance to critically important antimicrobials in Australian silver gulls (*Chroicocephalus novaehollandiae*) and evidence of anthropogenic origins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **74**: 2566–2574, 2019. DOI: [10.1093/jac/dkz242](https://doi.org/10.1093/jac/dkz242) (cf p. 44)
- [246] G. Zarfel, H. Galler, G. Feierl, *et al.* Comparison of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (ESBL) carrying *Escherichia coli* from sewage sludge and human urinary tract infection. *Environmental Pollution*, **173**: 192–199, 2013. DOI: [10.1016/j.envpol.2012.09.019](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.09.019) (cf p. 45)
- [247] L. Jakobsen, D. Sandvang, L. H. Hansen, *et al.* Characterisation, dissemination and persistence of gentamicin resistant *Escherichia coli* from a Danish university hospital to the waste water environment. *Environment International*, **34**: 108–115, 2008. DOI: [10.1016/j.envint.2007.07.011](https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.07.011) (cf p. 45)
- [248] S. Guyomard-Rabenirina, C. Dartron, M. Falord, *et al.* Resistance to antimicrobial drugs in different surface waters and wastewaters of Guadeloupe. *PloS One*, **12**: e0173155, 2017. DOI: [10.1371/journal.pone.0173155](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173155) (cf p. 45)
- [249] M. Dolejska, P. Frolkova, M. Florek, *et al.* CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone B2-O25b-ST131 and *Klebsiella spp.* isolates in municipal wastewater treatment plant effluents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **66**: 2784–2790, 2011. DOI: [10.1093/jac/dkr363](https://doi.org/10.1093/jac/dkr363) (cf p. 45)
- [250] S. B. Jørgensen, A. V. Søråas, L. S. Arnesen, T. M. Leegaard, A. Sundsfjord, and P. A. Jenum. A comparison of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* from clinical, recreational water and wastewater samples associated in time and location. *PloS One*, **12**: e0186576, 2017. DOI: [10.1371/journal.pone.0186576](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186576) (cf p. 45)

- [251] V. Calhau, C. Mendes, A. Pena, N. Mendonça, and G. J. Da Silva. Virulence and plasmidic resistance determinants of *Escherichia coli* isolated from municipal and hospital wastewater treatment plants. *Journal of Water and Health*, **13**: 311–318, 2015. DOI: [10 . 2166 / wh . 2014 . 327](https://doi.org/10.2166/wh.2014.327) (cf p. 45)
- [252] G. C. A. Amos, P. M. Hawkey, W. H. Gaze, and E. M. Wellington. Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **69**: 1785–1791, 2014. DOI: [10 . 1093 / jac / dku079](https://doi.org/10.1093/jac/dku079) (cf p. 45)
- [253] T. Finn, J. Pitout, and R. DeVinney. *ECCMID -Paper Poster #P1456- The distribution of Escherichia coli sequence type 131 in wastewater in Calgary, Canada*. Amsterdam, 2019. (cf p. 45)
- [254] M. Colomer-Lluch, A. Mora, C. López, *et al.* Detection of quinolone-resistant *Escherichia coli* isolates belonging to clonal groups O25b:H4-B2-ST131 and O25b:H4-D-ST69 in raw sewage and river water in Barcelona, Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68**: 758–765, 2013. DOI: [10 . 1093 / jac / dks477](https://doi.org/10.1093/jac/dks477) (cf p. 45)
- [255] R. Gomi, T. Matsuda, Y. Matsumura, *et al.* Whole-genome analysis of antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in river water. *Applied and Environmental Microbiology*, **83**: 2017. DOI: [10 . 1128 / AEM . 02703 - 16](https://doi.org/10.1128/AEM.02703-16) (cf p. 45)
- [256] S. Li, Z. C. Zhu, L. Wang, Y. F. Zhou, Y. J. Tang, and Z. M. Miao. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in spring waters. *Letters in Applied Microbiology*, **61**: 544–548, 2015. DOI: [10 . 1111 / lam . 12489](https://doi.org/10.1111/lam.12489) (cf p. 45)
- [257] M. Diab, M. Hamze, R. Bonnet, E. Saras, J.-Y. Madec, and M. Haenni. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in water sources in Lebanon. *Veterinary Microbiology*, **217**: 97–103, 2018. DOI: [10 . 1016 / j . vetmic . 2018 . 03 . 007](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.007) (cf p. 45)
- [258] M. L. Power, A. Samuel, J. J. Smith, J. S. Stark, M. R. Gillings, and D. M. Gordon. *Escherichia coli* out in the cold: Dissemination of human-derived bacteria into the Antarctic microbiome. *Environmental Pollution*, **215**: 58–65, 2016. DOI: [10 . 1016 / j . envpol . 2016 . 04 . 013](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.013) (cf p. 45)
- [259] A. R. Manges, H. M. Geum, A. Guo, T. J. Edens, C. D. Fibke, and J. D. D. Pitout. Global extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages. *Clinical Microbiology Reviews*, **32**: e00135–18, 2019. DOI: [10 . 1128 / CMR . 00135 - 18](https://doi.org/10.1128/CMR.00135-18) (cf p. 46)
- [260] A. McNally, T. Kallonen, C. Connor, *et al.* Diversification of colonization factors in a multidrug-resistant *Escherichia coli* lineage evolving under negative frequency-dependent selection. *mBio*, **10**: e00644–19, 2019. DOI: [10 . 1128 / mBio . 00644 - 19](https://doi.org/10.1128/mBio.00644-19) (cf pp. 46, 50, 51, 63)
- [261] C. Darwin. *On the origin of species by means of natural selection, or, The preservation of favoured races in the struggle for life* /. London : John Murray, 1859. (cf p. 48)
- [262] H. Spencer. *The principles of biology. Tome 1 / by Herbert Spencer*, 1864. (cf p. 48)
- [263] M. Diard and W.-D. Hardt. Evolution of bacterial virulence. *FEMS microbiology reviews*, **41**: 679–697, 2017. DOI: [10 . 1093 / femsre / fux023](https://doi.org/10.1093/femsre/fux023) (cf pp. 48, 52, 167, 168)
- [264] A. Bleibtreu, P.-A. Gros, C. Laouénan, *et al.* Fitness, stress resistance, and extraintestinal virulence in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, **81**: 2733–2742, 2013. DOI: [10 . 1128 / IAI . 01329 - 12](https://doi.org/10.1128/IAI.01329-12) (cf pp. 48, 164)

- [265] P. S. Cohen, R. Rossoll, V. J. Cabelli, S. L. Yang, and D. C. Laux. Relationship between the mouse colonizing ability of a human fecal *Escherichia coli* strain and its ability to bind a specific mouse colonic mucous gel protein. *Infection and Immunity*, **40**: 62–69, 1983. (cf p. 48)
- [266] A. J. Mathers, G. Peirano, and J. D. D. Pitout. Chapter Four -*Escherichia coli* ST131: The quintessential example of an international multiresistant high-risk clone. *Advances in Applied Microbiology*, **90**: 109–154, 2015. DOI: [10.1016/bs.aambs.2014.09.002](https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.002) (cf pp. 49, 68)
- [267] F. Blanquart. Evolutionary epidemiology models to predict the dynamics of antibiotic resistance. *Evolutionary Applications*, **12**: 365–383, 2019. DOI: [10.1111/eva.12753](https://doi.org/10.1111/eva.12753) (cf p. 49)
- [268] F. Blanquart, S. Lehtinen, M. Lipsitch, and C. Fraser. The evolution of antibiotic resistance in a structured host population. *Journal of the Royal Society, Interface*, **15**: 2018. DOI: [10.1098/rsif.2018.0040](https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0040) (cf p. 49)
- [269] D. Roux, O. Danilchanka, T. Guillard, *et al.* Fitness cost of antibiotic susceptibility during bacterial infection. *Science Translational Medicine*, **7**: 297ra114–297ra114, 2015. DOI: [10.1126/scitranslmed.aab1621](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aab1621) (cf p. 50)
- [270] P. Basra, A. Alsaadi, G. Bernal-Astrain, *et al.* Fitness tradeoffs of antibiotic resistance in extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Genome Biology and Evolution*, **10**: 667–679, 2018. DOI: [10.1093/gbe/evy030](https://doi.org/10.1093/gbe/evy030) (cf p. 50)
- [271] L. L. Marcusson, N. Frimodt-Møller, and D. Hughes. Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness. *PLoS pathogens*, **5**: e1000541, 2009. DOI: [10.1371/journal.ppat.1000541](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000541) (cf p. 50)
- [272] D. L. Huseby, F. Pietsch, G. Brandis, L. Garoff, A. Tegehall, and D. Hughes. Mutation supply and relative fitness shape the genotypes of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*, **34**: 1029–1039, 2017. DOI: [10.1093/molbev/msx052](https://doi.org/10.1093/molbev/msx052) (cf pp. 50, 161)
- [273] J. Turret, M. Diard, L. Garry, I. Matic, and E. Denamur. Effects of single and multiple pathogenicity island deletions on uropathogenic *Escherichia coli* strain 536 intrinsic extra-intestinal virulence. *International journal of medical microbiology*, **300**: 435–439, 2010. DOI: [10.1016/j.ijmm.2010.04.013](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.04.013) (cf p. 52)
- [274] A. L. Lloyd, T. A. Henderson, P. D. Vigil, and H. L. T. Mobley. Genomic islands of uropathogenic *Escherichia coli* contribute to virulence. *Journal of Bacteriology*, **191**: 3469–3481, 2009. DOI: [10.1128/JB.01717-08](https://doi.org/10.1128/JB.01717-08) (cf p. 52)
- [275] J. R. Johnson, O. Clermont, M. Menard, M. A. Kuskowski, B. Picard, and E. Denamur. Experimental mouse lethality of *Escherichia coli* isolates, in relation to accessory traits, phylogenetic group, and ecological source. *The Journal of Infectious Diseases*, **194**: 1141–1150, 2006. DOI: [10.1086/507305](https://doi.org/10.1086/507305) (cf p. 52)
- [276] J. Hacker and J. B. Kaper. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Review of Microbiology*, **54**: 641–679, 2000. DOI: [10.1146/annurev.micro.54.1.641](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.641) (cf p. 52)
- [277] M. A. Croxen and B. B. Finlay. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews. Microbiology*, **8**: 26–38, 2010. DOI: [10.1038/nrmicro2265](https://doi.org/10.1038/nrmicro2265) (cf p. 52)

- [278] J. R. Johnson, B. Johnston, C. Clabots, M. A. Kuskowski, and M. Castanheira. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, **51**: 286–294, 2010. DOI: [10.1086/653932](https://doi.org/10.1086/653932) (cf p. 53)
- [279] M. K. Cha, C.-I. Kang, S. H. Kim, *et al.* Comparison of the microbiological characteristics and virulence factors of ST131 and non-ST131 clones among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **84**: 102–104, 2016. DOI: [10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.015](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.015) (cf p. 53)
- [280] S. Shaik, A. Ranjan, S. K. Tiwari, *et al.* Comparative genomic analysis of globally dominant ST131 clone with other epidemiologically successful extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages. *mBio*, **8**: e01596–17, 2017. DOI: [10.1128/mBio.01596-17](https://doi.org/10.1128/mBio.01596-17) (cf pp. 53, 168)
- [281] M.-H. Nicolas-Chanoine, J. Blanco, V. Leflon-Guibout, *et al.* Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **61**: 273–281, 2007. DOI: [10.1093/jac/dkm464](https://doi.org/10.1093/jac/dkm464) (cf p. 53)
- [282] R. Banerjee, A. Robicsek, M. A. Kuskowski, *et al.* Molecular epidemiology of *Escherichia coli* sequence type 131 and its H30 and H30-Rx subclones among extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-positive and -negative *E. coli* clinical isolates from the Chicago Region, 2007 to 2010. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**: 6385–6388, 2013. DOI: [10.1128/AAC.01604-13](https://doi.org/10.1128/AAC.01604-13) (cf pp. 53, 54)
- [283] I. Merino, S. B. Porter, B. D. Johnston, *et al.* Virulence genes and subclone status as markers of experimental virulence in a murine sepsis model among *Escherichia coli* sequence type 131 clinical isolates from Spain. *PLoS One*, **12**: e0188838, 2017. DOI: [10.1371/journal.pone.0188838](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188838) (cf pp. 53, 54)
- [284] B. Olesen, J. Frimodt-Møller, R. F. Leihof, *et al.* Temporal trends in antimicrobial resistance and virulence-associated traits within the *Escherichia coli* sequence type 131 clonal group and its H30 and H30-Rx subclones, 1968 to 2012. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58**: 6886–6895, 2014. DOI: [10.1128/AAC.03679-14](https://doi.org/10.1128/AAC.03679-14) (cf pp. 53, 54, 61)
- [285] A. Mora, G. Dahbi, C. López, *et al.* Virulence patterns in a murine sepsis model of ST131 *Escherichia coli* clinical isolates belonging to serotypes O25b:H4 and O16:H5 are associated to specific virotypes. *PLoS ONE*, **9**: e87025, 2014. DOI: [10.1371/journal.pone.0087025](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087025) (cf pp. 53, 55, 164)
- [286] H. Ciesielczuk, J. Betts, L. Phee, *et al.* Comparative virulence of urinary and bloodstream isolates of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* in a *Galleria mellonella* model. *Virulence*, **6**: 145–151, 2015. DOI: [10.4161/21505594.2014.988095](https://doi.org/10.4161/21505594.2014.988095) (cf p. 54)
- [287] A. Pantel, C. Dunyach-Remy, C. Ngba Essebe, *et al.* Modulation of membrane influx and efflux in *Escherichia coli* sequence type 131 has an impact on bacterial motility, biofilm formation, and virulence in a *Caenorhabditis elegans* model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **60**: 2901–2911, 2016. DOI: [10.1128/AAC.02872-15](https://doi.org/10.1128/AAC.02872-15) (cf pp. 55, 161)
- [288] J.-P. Lavigne, A. C. Vergunst, L. Goret, *et al.* Virulence potential and genomic mapping of the worldwide clone *Escherichia coli* ST131. *PLoS One*, **7**: e34294, 2012. DOI: [10.1371/journal.pone.0034294](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034294) (cf pp. 55, 164)

- [289] J. R. Johnson, S. B. Porter, G. Zhanel, M. A. Kuskowski, and E. Denamur. Virulence of *Escherichia coli* clinical isolates in a murine sepsis model in relation to sequence type ST131 status, fluoroquinolone resistance, and virulence genotype. *Infection and Immunity*, **80**: 1554–1562, 2012. DOI: [10.1128/IAI.06388-11](https://doi.org/10.1128/IAI.06388-11) (cf pp. 55, 164)
- [290] F. L. Nowrouzian, I. Adlerberth, and A. E. Wold. Enhanced persistence in the colonic microbiota of *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2: role of virulence factors and adherence to colonic cells. *Microbes and Infection*, **8**: 834–840, 2006. DOI: [10.1016/j.micinf.2005.10.011](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.10.011) (cf p. 56)
- [291] S. Ahmed, G. T. Macfarlane, A. Fite, A. J. McBain, P. Gilbert, and S. Macfarlane. Mucosa-associated bacterial diversity in relation to human terminal ileum and colonic biopsy samples. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 7435–7442, 2007. DOI: [10.1128/AEM.01143-07](https://doi.org/10.1128/AEM.01143-07) (cf p. 56)
- [292] G. T. M. S. Macfarlane M. J. Hopkins. Bacterial growth and metabolism on surfaces in the large intestine. *Microbial Ecology in Health and Disease*, **12**: 64–72, 2000. DOI: [10.1080/089106000750060314](https://doi.org/10.1080/089106000750060314) (cf p. 56)
- [293] F. Nowrouzian, B. Hesselmar, R. Saalman, *et al.* *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatric Research*, **54**: 8, 2003. DOI: [10.1203/01.PDR.0000069843.20655.EE](https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000069843.20655.EE) (cf p. 56)
- [294] G. G. Anderson, J. J. Palermo, J. D. Schilling, R. Roth, J. Heuser, and S. J. Hultgren. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science*, **301**: 105–107, 2003. DOI: [10.1126/science.1084550](https://doi.org/10.1126/science.1084550) (cf pp. 56, 61, 64)
- [295] S. Subashchandrabose and H. L. T. Mobley. Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, **3**: 2015. DOI: [10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012) (cf p. 56)
- [296] A. Roux and J.-M. Ghigo. Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 261, 2006. DOI: [10.4267/2042/47842](https://doi.org/10.4267/2042/47842) (cf p. 56)
- [297] D. Lebeaux, J.-M. Ghigo, and C. Beloin. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiology and molecular biology reviews*, **78**: 510–543, 2014. DOI: [10.1128/MMBR.00013-14](https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-14) (cf p. 57)
- [298] C. Beloin, A. Roux, and J. M. Ghigo. *Escherichia coli* biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 249–289, 2008. DOI: [10.1007/978-3-540-75418-3\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_12) (cf p. 57)
- [299] E. T. E. Niba, Y. Naka, M. Nagase, H. Mori, and M. Kitakawa. A genome-wide approach to identify the genes involved in biofilm formation in *Escherichia coli*. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, **14**: 237–246, 2007. DOI: [10.1093/dnares/dsm024](https://doi.org/10.1093/dnares/dsm024) (cf p. 57)
- [300] C. Sakamoto. Study of the regulatory network of the surface autotransported adhesin antigen 43 in *Escherichia coli*. *PhD thesis*, Paris 7, 2013. eprint: <http://www.theses.fr/2013PA077205> (cf pp. 57–60)
- [301] R. Fronzes, H. Remaut, and G. Waksman. Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *The EMBO Journal*, **27**: 2271–2280, 2008. DOI: [10.1038/emboj.2008.155](https://doi.org/10.1038/emboj.2008.155) (cf pp. 57, 162)
- [302] R. G. Gerlach and M. Hensel. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *International journal of medical microbiology*, **297**: 401–415, 2007. DOI: [10.1016/j.ijmm.2007.03.017](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.017) (cf p. 57)

- [303] E. Brombacher, C. Dorel, A. J. B. Zehnder, and P. Landini. The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiology*, **149**: 2847–2857, 2003. DOI: [10.1099/mic.0.26306-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.26306-0) (cf p. 58)
- [304] J. Grégory. Formation de biofilms par *Escherichia coli* K-12 : rôle des systèmes à deux composants dans la synthèse des curli. *PhD thesis*, INSA Lyon, 2005. (cf p. 58)
- [305] W. R. Schwan, M. T. Beck, C. S. Hung, and S. J. Hultgren. Differential regulation of *Escherichia coli* *fim* genes following binding to mannose receptors. *Journal of Pathogens*, **2018**: 2897581, 2018. DOI: [10.1155/2018/2897581](https://doi.org/10.1155/2018/2897581) (cf pp. 58, 65)
- [306] W. R. Schwan and H. Ding. Temporal regulation of *fim* genes in uropathogenic *Escherichia coli* during infection of the murine urinary tract. *Journal of Pathogens*, **2017**: 8694356, 2017. DOI: [10.1155/2017/8694356](https://doi.org/10.1155/2017/8694356) (cf pp. 58–60, 66)
- [307] E. V. Sokurenko, H. S. Courtney, J. Maslow, A. Siitonen, and D. L. Hasty. Quantitative differences in adhesiveness of type 1 fimbriated *Escherichia coli* due to structural differences in *fimH* genes. *Journal of Bacteriology*, **177**: 3680–3686, 1995. DOI: [10.1128/jb.177.13.3680-3686.1995](https://doi.org/10.1128/jb.177.13.3680-3686.1995) (cf p. 58)
- [308] E. V. Sokurenko, V. Chesnokova, R. J. Doyle, and D. L. Hasty. Diversity of the *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin differential binding to mannosides and uroepithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, **272**: 17880–17886, 1997. DOI: [10.1074/jbc.272.28.17880](https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17880) (cf p. 58)
- [309] E. V. Sokurenko, V. Chesnokova, D. E. Dykhuizen, *et al.* Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**: 8922–8926, 1998. (cf pp. 58, 59, 61)
- [310] L. K. Mydock-McGrane, T. J. Hannan, and J. W. Janetka. Rational design strategies for FimH antagonists: new drugs on the horizon for urinary tract infection and Crohn’s disease. *Expert opinion on drug discovery*, **12**: 711–731, 2017. DOI: [10.1080/17460441.2017.1331216](https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1331216) (cf p. 59)
- [311] J. J. Martinez, M. A. Mulvey, J. D. Schilling, J. S. Pinkner, and S. J. Hultgren. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *The EMBO Journal*, **19**: 2803–2812, 2000. DOI: [10.1093/emboj/19.12.2803](https://doi.org/10.1093/emboj/19.12.2803) (cf p. 59)
- [312] M. A. Mulvey, J. D. Schilling, and S. J. Hultgren. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infection and Immunity*, **69**: 4572–4579, 2001. DOI: [10.1128/IAI.69.7.4572-4579.2001](https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4572-4579.2001) (cf p. 59)
- [313] J. P. Nataro, S. Hicks, A. D. Phillips, P. A. Vial, and C. L. Sears. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Infection and Immunity*, **64**: 4761–4768, 1996. (cf p. 60)
- [314] S. Tzipori, J. Montanaro, R. M. Robins-Browne, P. Vial, R. Gibson, and M. M. Levine. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. *Infection and Immunity*, **60**: 5302–5306, 1992. (cf p. 60)
- [315] P. A. Vial, R. Robins-Browne, H. Lior, *et al.* Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *The Journal of Infectious Diseases*, **158**: 70–79, 1988. DOI: [10.1093/infdis/158.1.70](https://doi.org/10.1093/infdis/158.1.70) (cf p. 60)



- [316] J. Schiebel, A. Böhm, J. Nitschke, *et al.* Genotypic and phenotypic characteristics associated with biofilm formation by human clinical *Escherichia coli* isolates of different pathotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, **83**: 2017. DOI: [10.1128/AEM.01660-17](https://doi.org/10.1128/AEM.01660-17) (cf p. 60)
- [317] M. Martinez-Medina, P. Naves, J. Blanco, *et al.* Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC). *BMC microbiology*, **9**: 202, 2009. DOI: [10.1186/1471-2180-9-202](https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-202) (cf p. 60)
- [318] J. Agarwal, B. Mishra, S. Srivastava, and R. Srivastava. Genotypic characteristics and biofilm formation among *Escherichia coli* isolates from Indian women with acute cystitis. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **107**: 183–187, 2013. DOI: [10.1093/trstmh/trs090](https://doi.org/10.1093/trstmh/trs090) (cf p. 61)
- [319] R. E. Watts, V. Hancock, C.-L. Y. Ong, *et al.* *Escherichia coli* isolates causing asymptomatic bacteriuria in catheterized and noncatheterized individuals possess similar virulence properties. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**: 2449–2458, 2010. DOI: [10.1128/JCM.01611-09](https://doi.org/10.1128/JCM.01611-09) (cf p. 61)
- [320] T. Tapiainen, A.-M. Hanni, J. Salo, I. Ikäheimo, and M. Uhari. *Escherichia coli* biofilm formation and recurrences of urinary tract infections in children. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **33**: 111–115, 2014. DOI: [10.1007/s10096-013-1935-4](https://doi.org/10.1007/s10096-013-1935-4) (cf p. 61)
- [321] S. Paul, E. V. Linardopoulou, M. Billig, *et al.* Role of homologous recombination in adaptive diversification of extraintestinal *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **195**: 231–242, 2013. DOI: [10.1128/JB.01524-12](https://doi.org/10.1128/JB.01524-12) (cf p. 61)
- [322] A. Novais, J. Pires, H. Ferreira, *et al.* Characterization of globally spread *Escherichia coli* ST131 isolates (1991 to 2010). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **56**: 3973–3976, 2012. DOI: [10.1128/AAC.00475-12](https://doi.org/10.1128/AAC.00475-12) (cf p. 61)
- [323] L. Surgers, A. Boyd, P.-M. Girard, G. Arlet, and D. Decré. Biofilm formation by ESBL-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of medical microbiology: IjMM*, **309**: 13–18, 2019. DOI: [10.1016/j.ijmm.2018.10.008](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.10.008) (cf pp. 61, 161)
- [324] E. Olivares, S. Badel-Berchoux, C. Provot, *et al.* The BioFilm Ring Test: a rapid method for routine analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation kinetics. *Journal of Clinical Microbiology*, **54**: 657–661, 2016. DOI: [10.1128/JCM.02938-15](https://doi.org/10.1128/JCM.02938-15) (cf p. 62)
- [325] S. Sarkar, D. Vagenas, M. A. Schembri, and M. Totsika. Biofilm formation by multidrug resistant *Escherichia coli* ST131 is dependent on type 1 fimbriae and assay conditions. *Pathogens and Disease*, **74**: 2016. DOI: [10.1093/femspd/ftw013](https://doi.org/10.1093/femspd/ftw013) (cf p. 62)
- [326] S. Sarkar, L. W. Roberts, M.-D. Phan, *et al.* Comprehensive analysis of type 1 fimbriae regulation in *fimB*-null strains from the multidrug resistant *Escherichia coli* ST131 clone. *Molecular Microbiology*, **101**: 1069–1087, 2016. DOI: [10.1111/mmi.13442](https://doi.org/10.1111/mmi.13442) (cf pp. 62, 161, 165)
- [327] Yamamoto Shingo, Tsukamoto Teizo, Terai Akito, Kurazono Hisao, Takeda Yoshifumi, and Yoshida Osamu. Genetic evidence supporting the fecal-perineal-urethral hypothesis in cystitis caused by *Escherichia coli*. *Journal of Urology*, **157**: 1127–1129, 1997. DOI: [10.1016/S0022-5347\(01\)65154-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)65154-1) (cf p. 63)

- [328] A. Ostblom, I. Adlerberth, A. E. Wold, and F. L. Nowrouzian. Pathogenicity island markers, virulence determinants *malX* and *usp*, and the capacity of *Escherichia coli* to persist in infants' commensal microbiotas. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**: 2303–2308, 2011. DOI: [10.1128/AEM.02405-10](https://doi.org/10.1128/AEM.02405-10) (cf p. 63)
- [329] K. Kondratyeva, A. Wollman, G. Gerlitz, and S. Navon-Venezia. Adhesion and invasion to epithelial cells and motility of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* reveal ST131 superiority: a comparative in vitro study of extraintestinal pathogenic *E. coli* lineages. *Journal of Medical Microbiology*, **66**: 1350–1357, 2017. DOI: [10.1099/jmm.0.000549](https://doi.org/10.1099/jmm.0.000549) (cf p. 63)
- [330] S. Sarkar, M. L. Hutton, D. Vagenas, *et al.* Intestinal colonization traits of pandemic multidrug-resistant *Escherichia coli* ST131. *The Journal of Infectious Diseases*, **218**: 979–990, 2018. DOI: [10.1093/infdis/jiy031](https://doi.org/10.1093/infdis/jiy031) (cf pp. 63, 64, 164, 166)
- [331] G. Peirano, G. L. Mulvey, G. D. Armstrong, and J. D. D. Pitout. Virulence potential and adherence properties of *Escherichia coli* that produce CTX-M and NDM  $\beta$ -lactamases. *Journal of Medical Microbiology*, **62**: 525–530, 2013. DOI: [10.1099/jmm.0.048983-0](https://doi.org/10.1099/jmm.0.048983-0) (cf p. 63)
- [332] S. Vimont, A. Boyd, A. Bleibtreu, *et al.* The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone O25b:H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities. *PloS One*, **7**: e46547, 2012. DOI: [10.1371/journal.pone.0046547](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046547) (cf pp. 63, 66, 163, 165)
- [333] C. W. Russell, B. A. Fleming, C. A. Jost, *et al.* Context-dependent requirements for FimH and other canonical virulence factors in gut colonization by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, **86**: 2018. DOI: [10.1128/IAI.00746-17](https://doi.org/10.1128/IAI.00746-17) (cf p. 63)
- [334] A. Sheikh, R. Rashu, Y. A. Begum, *et al.* Highly conserved type 1 pili promote enterotoxigenic *Escherichia coli* pathogen-host interactions. *PLoS neglected tropical diseases*, **11**: e0005586, 2017. DOI: [10.1371/journal.pntd.0005586](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005586) (cf p. 63)
- [335] T. K. Korhonen, R. Virkola, and H. Holthöfer. Localization of binding sites for purified *Escherichia coli* P fimbriae in the human kidney. *Infection and Immunity*, **54**: 328–332, 1986. (cf p. 65)
- [336] D. A. Rosen, T. M. Hooton, W. E. Stamm, P. A. Humphrey, and S. J. Hultgren. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS medicine*, **4**: e329, 2007. DOI: [10.1371/journal.pmed.0040329](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040329) (cf p. 66)
- [337] E. Salvador, F. Wagenlehner, C.-D. Köhler, *et al.* Comparison of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* isolates from healthy individuals versus those from hospital patients shows that long-term bladder colonization selects for attenuated virulence phenotypes. *Infection and Immunity*, **80**: 668–678, 2012. DOI: [10.1128/IAI.06191-11](https://doi.org/10.1128/IAI.06191-11) (cf pp. 66, 169)
- [338] J. Blanco, A. Mora, R. Mamani, *et al.* National survey of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **66**: 2011–2021, 2011. DOI: [10.1093/jac/dkr235](https://doi.org/10.1093/jac/dkr235) (cf p. 161)
- [339] S.-C. Flament-Simon, M. Duprilot, N. Mayer, *et al.* Association between kinetics of early biofilm formation and clonal lineage in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, **10**: 1183, 2019. DOI: [10.3389/fmicb.2019.01183](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01183) (cf p. 161)
- [340] P. J. Kerr. Myxomatosis in Australia and Europe: A model for emerging infectious diseases. *Antiviral Research*, **93**: 387–415, 2012. DOI: [10.1016/j.antiviral.2012.01.009](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.01.009) (cf p. 167)

- [341] S. Chattopadhyay, M. Feldgarden, S. J. Weissman, D. E. Dykhuizen, G. van Belle, and E. V. Sokurenko. Haplotype diversity in “source-sink” dynamics of *Escherichia coli* urovirulence. *Journal of Molecular Evolution*, **64**: 204, 2006. DOI: [10.1007/s00239-006-0063-5](https://doi.org/10.1007/s00239-006-0063-5) (cf p. 169)
- [342] T. Homeier, T. Semmler, L. H. Wieler, and C. Ewers. The GimA locus of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: does reductive evolution correlate with habitat and pathotype? *PloS One*, **5**: e10877, 2010. DOI: [10.1371/journal.pone.0010877](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010877) (cf p. 172)
- [343] U. Frömmel, W. Lehmann, S. Rödiger, *et al.* Adhesion of human and animal *Escherichia coli* strains in association with their virulence-associated genes and phylogenetic origins. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**: 5814–5829, 2013. DOI: [10.1128/AEM.01384-13](https://doi.org/10.1128/AEM.01384-13) (cf p. 172)
- [344] M. Fléchar, M. A. M. Cortes, M. Répérant, and P. Germon. New role for the *ibeA* gene in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress resistance of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **194**: 4550–4560, 2012. DOI: [10.1128/JB.00089-12](https://doi.org/10.1128/JB.00089-12) (cf p. 172)
- [345] M. A. M. Cortes, J. Gibon, N. K. Chanteloup, M. Moulin-Schouleur, P. Gilot, and P. Germon. Inactivation of *ibeA* and *ibeT* results in decreased expression of type 1 fimbriae in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908. *Infection and Immunity*, **76**: 4129–4136, 2008. DOI: [10.1128/IAI.00334-08](https://doi.org/10.1128/IAI.00334-08) (cf p. 172)
- [346] R. J. Cieza, J. Hu, B. N. Ross, E. Sbrana, and A. G. Torres. The IbeA invasin of adherent-invasive *Escherichia coli* mediates interaction with intestinal epithelia and macrophages. *Infection and Immunity*, **83**: 1904–1918, 2015. DOI: [10.1128/IAI.03003-14](https://doi.org/10.1128/IAI.03003-14) (cf p. 172)
- [347] R. Freter, H. Brickner, J. Fekete, M. M. Vickerman, and K. E. Carey. Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract. *Infection and Immunity*, **39**: 686–703, 1983. (cf p. 172)