



**HAL**  
open science

## Etude de la colibactine dans les infections urinaires

Camille Chagneau

► **To cite this version:**

Camille Chagneau. Etude de la colibactine dans les infections urinaires. Microbiologie et Parasitologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2021. Français. NNT : 2021TOU30227 . tel-03934796

**HAL Id: tel-03934796**

**<https://theses.hal.science/tel-03934796v1>**

Submitted on 11 Jan 2023

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

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



# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par

**Camille CHAGNEAU**

Le 25 novembre 2021

**Etude de la colibactine dans les infections urinaires**

---

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

Spécialité : **MICROBIOLOGIE**

Unité de recherche :

**IRSD - Institut de Recherche en Santé Digestive**

Thèse dirigée par

**Eric OSWALD et Jean-philippe NOUGAYREDE**

Jury

Mme Marie-Cécile PLOY, Rapporteuse & Présidente

M. Laurent BOYER, Rapporteur

M. Eric OSWALD, Directeur de thèse

M. Jean-Philippe NOUGAYREDE, Co-directeur de thèse

## Remerciements

Mes remerciements les plus sincères

A Madame le Professeur **Marie-Cécile Ploy**, rapporteur

J'ai eu la chance de faire mes premiers pas d'interne dans votre service et vous m'avez alors confortée dans mon envie de poursuivre en bactériologie. Vous me faites aujourd'hui l'honneur de juger mon travail de thèse comme clôture de ces riches et longues années – la boucle est bouclée. Je tiens à vous exprimer ma reconnaissance et mon admiration.

A Monsieur le Docteur **Laurent Boyer**, rapporteur

Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse avec enthousiasme, et de me faire l'honneur de participer à ce jury. Soyez assuré de mon plus grand respect.

A Monsieur le Docteur **Jean-Philippe Nougayrède**, co-directeur de thèse

Je te remercie d'avoir, un jour, accepté de co-diriger cette thèse et de consacrer du temps pour me guider. Ce travail n'aurait jamais été le même sans toi, ton expertise, tes conseils, tes remarques toujours pertinentes. Merci pour toutes ces discussions et hypothèses qui ont et continuent de nourrir ma curiosité. J'espère sincèrement continuer à travailler à tes côtés pour tenter de percer peut-être un jour les mystères de la colibactine.

A Monsieur le Professeur **Eric Oswald**, co-directeur de thèse

Je vous suis reconnaissante de m'avoir accueillie dans votre équipe de recherche depuis près de cinq ans et aujourd'hui également au laboratoire hospitalier. Je vous remercie de croire en moi (parfois peut-être un peu trop) et de m'avoir encouragée à m'engager dans cette aventure passionnante qu'est la thèse. Je vous remercie pour votre confiance, votre disponibilité, vos précieux conseils et votre enthousiasme scientifique communicatif.

Je tiens également à remercier l'ensemble des personnes qui ont été présentes et m'ont soutenue de près ou de loin durant ces dernières années.

En particulier, un très grand merci à la merveilleuse équipe 2 de l'IRSD, si haute en couleurs, pour son ambiance, son aide au quotidien et ses râleries (plus pour certains que pour d'autres) : Min (my « wife » of thesis), Priscilla, Laure, Marie, Nadège, Clémence, Marion, Delphine, Christine, Nicolas, Alexandre, Fred, Frédéric, Matteo, Cécile, Cécile, Corentin, Benjamin, Pierre-Jean, Laëtitia, Laëtitia, Christophe, Michèle, Claude, Jean-Paul, Rachel... et ceux que malheureusement j'oublie ! Je ne suis plus là autant que je l'aimerais mais c'est toujours un plaisir de venir vous voir !

Un grand merci aux autres membres de l'IRSD qui m'ont épaulée dans ce projet : en particulier Nicolas Cénac pour les extractions lipidiques (mais aussi toute l'équipe Dietrich pour sa bonne humeur !), Céline Besson, Hélène Coppin et Marie-Paule Roth pour leur collaboration dans UTI-Toul, leur bienveillance et leur aide précieuse lors de mes demandes de financement que je n'ai pas oubliées.

Un merci tout particulier aux membres de VibioSphen (Maxime, Christophe, Alexandre) pour leur disponibilité et leur expertise : sans vous ce projet n'aurait pas été le même. Un merci encore plus spécial à Patricia pour m'avoir la première accompagnée lors de mon Master 2 : merci encore de cet encadrement et de ta patience !

Je souhaite également remercier le personnel des plateaux que j'ai beaucoup sollicités et qui ont toujours été réactifs et plein de ressource, notamment Pauline de la lipidomique, Danièle, Sophie et Simon de l'imagerie et Florence, Annie, Samantha et Timothé de l'histologie !

Je remercie les membres de mon comité de thèse, Stéphane Cociancich et Pierre Delobel, d'avoir pris de leur temps pour le suivi de mes travaux.

Un immense merci à l'ensemble du Laboratoire de Bactériologie-Hygiène que j'ai la chance d'avoir rejoint en mai : merci aux techniciennes et techniciens pour leur patience face à mes hésitations, à Muriel pour son aide et son efficacité et aux biologistes pour le temps qu'ils consacrent à me (re)former et celui qu'ils me libèrent pour continuer la recherche ainsi que pour leur dynamisme et leur infinie bienveillance malgré ce contexte difficile. Merci !

Je remercie également mes nouveaux collègues de l'équipe de microbiologie de la faculté de pharmacie pour leur accueil et leur bienveillance.

Merci à l'ensemble de mes proches pour leur soutien et les moments de joie partagés durant ces dernières années, même s'ils n'ont malheureusement pas été assez fréquents avec la distance et les restrictions :

ma petite Lilie qui compte toujours autant pour moi,

mes amis du lycée dont je suis si fière (Fanouille, Toutoune, Mathilde, Charlotte, Méla, Kiki, Gauthier, Guillaume, Maxime, Kévin, Romain et Romain),

mes chaudières préférées (Flora, Fanny, Elia, Sandrine, Alba, Marine),

les anciens de la team Condorcet belle époque qui ont supporté maman Camille (Noémie, Fred, Gary, Emilie, Emily, Lucie) et les Limougeauds (Caro, Audrey, Simon, Le Loup),

mes p'tits LU gourmands Célinette et Pierre-Yves,

mes compagnons de Master, Lise et Sevan,

mes anciens co-internes tous bien plus biologistes que moi (Thomas, Louis-Thomas, Jules, Alice-Anne, Manu, Morgane, Tiphaine, Anthony, Elodie, Etienne, Samuel, Grégoire, Laurie, Karen, Marion, Thibaut, Sarah, Ayman, Shéshé, JK, Lucie, Audrey, Pauline et ceux que j'oublie),

les amis de Julien qui ont dû m'adopter : Bobo, Rob, Charly, les Genex, les Ruthénois. Merci de votre chaleur !

les Auscitains (Claire, Aurélie, Romu, Azadeh, Alcey, Caro) qui me font aimer le Gers,

mon collègue le plus poilu et le plus assidu pour la sieste : Toulouse,

ma famille et ma belle-famille pour leur amour et leur soutien permanent, un grand Merci,

ma moitié, qui plus que moi peut-être a souffert de ces moments de travail acharnés injustement arrachés à nous. J'aimerais te dire que c'est bientôt fini mais j'ai bien peur que ce ne soit que le début... Merci d'être là, immuable dans tous les moments, les bons comme les plus durs, et de me faire garder le sourire. Je t'aime.



# Table des matières

<b>Remerciements</b>	<b>2</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>6</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>9</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>10</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>11</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>13</b>
<b>I) Les infections urinaires</b>	<b>14</b>
A) Définitions et aspects cliniques	14
1) Les infections urinaires symptomatiques	14
a. Les cystites	15
b. Les pyélonéphrites	15
c. Les prostatites et infections urinaires masculines	15
2) Les colonisations bactériennes ou bactériuries asymptomatiques	16
3) Urine et microbiote urinaire	16
B) Epidémiologie	17
1) Importance en médecine humaine	17
2) Epidémiologie microbienne	18
3) Antibiorésistance	19
C) Qu'est-ce qu'une UPEC ?	21
1) L'espèce <i>E. coli</i> , une espèce très variable	22
2) Phylogénie des UPEC	23
a. Les UPEC appartiennent majoritairement au groupe phylogénétique B2 doté de capacités de virulence et de colonisation digestive	23
b. Les ST majoritaires des UPEC	25
3) Les facteurs de virulence associés aux UPEC	26
a. Les pili ou fimbriae	27
b. Les sidérophores	29
c. Les toxines	31
4) Les <i>E. coli</i> des bactériuries asymptomatiques : moins de virulence, une évolution vers le commensalisme ?	34
D) Physiopathologie des infections urinaires	35
1) La colonisation digestive : une étape clé préalable à l'infection urinaire	35
2) Déroulement de l'infection urinaire	36
3) Les UPEC, des bactéries intracellulaires facultatives	37
a. L'urothélium	37
b. Cycle intracellulaire	39
4) Réponses de l'hôte à l'infection urinaire	43
a. Réponse immunitaire (innée)	43
b. Douleur	46

<b>II) L'îlot <i>pks</i></b>	<b>49</b>
A) Présentation	49
1) Historique	49
2) Structure	49
3) Epidémiologie	50
B) Fonctionnement de la machinerie <i>pks</i> : état de l'art	50
1) Les PK-NRP et machineries PK-NRPS	50
a. Généralités	50
b. Les monomères	51
c. Les enzymes	52
d. Logique de l'élongation	52
2) Application à la colibactine	53
a. Activation de la machinerie	54
b. Synthèse de la chaîne linéaire	55
c. Finalisation de la structure dimérique de la précolibactine	56
d. Transport vers le périplasme	56
e. Clivage	57
f. Protection	57
g. Mécanismes de régulation	58
C) Les métabolites produits par la voie <i>pks</i>	59
1) La colibactine	60
a. Démarches d'élucidation de la structure utilisées	60
b. Relation structure-activité	61
c. Les colibactines macrocycliques	63
2) Les aminolipides	64
a. Le C14-Asn	64
b. Le C12-Asn-GABA	65
3) Connexion avec d'autres îlots de pathogénicité	65
a. Les sidérophores	65
b. Les sidérophores-microcines	66
D) L'îlot <i>pks</i> : quels effets et quelles conséquences sur l'hôte ?	67
1) Effet génotoxique de la colibactine et cancer	68
a. Dommages à l'ADN et activation de voies de réparation	68
b. Conséquences des dommages à l'ADN	69
c. Lien colibactine et cancer	70
2) L'îlot <i>pks</i> : un facteur de virulence ?	74
 <b>RESULTATS EXPERIMENTAUX</b>	 <b>75</b>
<b>Place du projet parmi mes différents travaux</b>	<b>76</b>
<b>Objectifs du travail expérimental présenté</b>	<b>77</b>
<b>Article 1 : The synergistic triad between microcin, colibactin, and salmochelin gene clusters in uropathogenic <i>Escherichia coli</i></b>	<b>78</b>
<b>Article 2 : Uropathogenic <i>E. coli</i> induces DNA damage in the bladder</b>	<b>86</b>
 <b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	 <b>118</b>
<b>I) Quel est le rôle de l'îlot <i>pks</i> ?</b>	<b>119</b>
A) L'îlot <i>pks</i> : présent et exprimé malgré un coût métabolique important	119

B)	L'îlot <i>pks</i> : un rôle potentiel dans la virulence ?	120
1)	Rôle des dommages liés à la génotoxine colibactine dans la virulence	120
2)	Rôle d'autres métabolites liés à l'îlot <i>pks</i> sur la réponse de l'hôte et notamment la douleur	122
3)	D'autres facteurs impliqués dans la colonisation urinaire ?	123
C)	L'îlot <i>pks</i> : un facteur de colonisation intestinale plus qu'un facteur de virulence ?	125
<b>II)</b>	<b>Quelles sont les conséquences sur l'hôte des UPEC <i>pks+</i> ?</b>	<b>128</b>
A)	Des dommages à l'ADN observés lors de l'infection	128
B)	Les infections urinaires à UPEC <i>pks+</i> , une cause du cancer de la vessie ?	131
<b>III)</b>	<b>Perspectives</b>	<b>134</b>
<b>IV)</b>	<b>Conclusion générale</b>	<b>136</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>137</b>
	<b>ANNEXES</b>	<b>159</b>
	<b>Liste des autres publications</b>	<b>160</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Activité et nom des principaux domaines fonctionnels des PK-NRPS.....	52
---	----

## Liste des figures

Figure 1 : Répartition des différents pathogènes isolés d'infections urinaires.....	19
Figure 2 : Résistance des <i>E. coli</i> aux antibiotiques. ....	20
Figure 3 : Contribution des éléments génétiques mobiles à l'évolution des <i>E. coli</i> pathogènes.....	23
Figure 4 : Groupes phylogénétiques de <i>E. coli</i> . ....	24
Figure 5 : Les quatre principaux types de pili impliqués dans les infections urinaires. ....	28
Figure 6 : Structure des sidérophores retrouvés chez <i>E. coli</i> . ....	30
Figure 7 : Physiopathologie des infections urinaires.....	37
Figure 8 : Organisation de l'urothélium. ....	38
Figure 9 : Modèle du cycle intracellulaire des UPEC. ....	40
Figure 10 : Le cycle intracellulaire des UPEC est facilement reproduit en modèle murin. ....	42
Figure 11 : Aperçu de la réponse immunitaire innée lors de l'infection urinaire dans la vessie. ....	44
Figure 12 : Douleur inflammatoire dans l'infection urinaire.....	48
Figure 13 : L'îlot <i>pks</i> .....	50
Figure 14 : Fonctionnement des machineries NRPS (A) et PKS (B). ....	53
Figure 15 : Schéma général de l'assemblage et de l'export de la colibactine ainsi que de la protection des bactéries vis-à-vis de la génotoxine.....	54
Figure 16 : Schéma de biosynthèse de la colibactine.....	55
Figure 17 : Les métabolites produits par la voie <i>pks</i> . ....	60
Figure 18 : Réactivité de la colibactine vis-à-vis de l'ADN.....	62
Figure 19 : Réactivité de la colibactine vis-à-vis de la double hélice d'ADN. ....	63
Figure 20 : Les colibactines macrocycliques.....	64
Figure 21 : Connexion par les phosphopanthéthéinyl transférase entre îlot <i>pks</i> et sidérophores. ....	66
Figure 22 : Modèle proposé pour la biosynthèse des sidérophores-microcines H47 et M chez <i>E. coli</i> Nissle1917. ....	67
Figure 23 : Dommages à l'ADN liés à la colibactine et conséquences. ....	69
Figure 24 : Quel est le rôle de l'îlot <i>pks</i> dans les infections urinaires ? .....	127
Figure 25 : Coupes de vessies murines incluses en paraffine 72h (a) et une semaine (b) après une infection par UTI89.....	129
Figure 26 : Quelles sont les conséquences des dommages à l'ADN des UPEC <i>pks+</i> ? .....	133

## Liste des abréviations

A : adénylation	DSS : sodium de sulfate-dextran
ABU : bactériurie asymptomatique	E : épimérase
ACP : acyl carrier protéine	EBLSE : entérobactérie productrice de BLSE
AOM : azoxyméthane	ECBU : examen cyto bactériologique des urines
APEC : <i>E. coli</i> pathogènes aviaires	ECDC : European Center for Disease prevention and Control
Asn : asparagine	ECOR : <i>E. coli</i> collection of reference strains
AT : acyltransférase	EHEC : <i>E. coli</i> entéro-hémorragiques
ATM : ataxia telangiectasia mutated	EIEC : <i>E. coli</i> entéro-invasifs
ATR : ataxia-telangiectasia and Rad3-related kinase	EPEC : <i>E. coli</i> entéro-pathogènes
AUM : unités asymétriques de membrane	ETEC : <i>E. coli</i> entérotoxinogènes
BBN : N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine	ExPEC : <i>E. coli</i> pathogènes extra-intestinaux
BLSE : bêta-lactamase à spectre étendu	FA : anémie de Fanconi
C : condensation	Fur : ferric uptake regulator
C12-Asn-GABA : C12-asparagine-acide $\gamma$ -amino-butyrique	GABA : acide $\gamma$ -amino-butyrique
C14-Asn : N-myristoyl-D-Asparagine ou C14-Asparagine	HlyA : $\alpha$ -hémolysine ou hémolysine A
C3G : céphalosporine de 3 <sup>ème</sup> génération	HGF : facteur de croissance hépato-cellulaire
CDC : centers for disease control and prevention	HPI : high pathogenicity island
CDT : toxine de distension cytoléthale	HPLC : chromatographie liquide haute performance
Chk : check-point kinase	IBC : communauté bactérienne intracellulaire
CNF1 : facteur de nécrose cytotoxique 1	IgA : immunoglobuline A
CoA : co-enzyme A	Krt : kératine
COX-2 : cyclo-oxygénase 2	KS : kétosynthase
Csr : carbone storage regulator	LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
CUP : chaperone usher pathway	LPS : lipopolysaccharide
Cy : cyclisation	MATE : multidrug and toxic compound extrusion
DON : déoxynivalénol	mGluR5 : récepteur métabotropique au glutamate 5
DNMT1 : de novo méthyltransférase 1	

MLST : multilocus sequence typing

NHEJ : non-homologous end-joining

NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

NMEC : *E. coli* impliqués dans les méningites néonatales

NRP : peptides non ribosomaux

NRPS : non ribosomal peptides synthase

ONERBA : Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques

ORF : open reading frame

Pap : pili associés aux pyélonéphrites

PCP : peptidyl carrier protein

PK : polykétide

PK-NRP : polykétides-peptides non ribosomaux

PK-NRPS : polykétide-peptide non ribosomal synthase

PKS : polykétide synthase

POLE : ADN polymérase  $\epsilon$

PPK : polyphosphate kinase

PPTase : phosphopantéthéinyl transférase

PRIMO : surveillance et prévention de la résistance aux antibiotiques et des infections associées aux soins en soins de ville et secteur médico-social

PRR : pattern recognition receptor

QIR : réservoir intracellulaire quiescent

SASP : phénotype sécrétoire associé à la sénescence

SFU : signes fonctionnels urinaires

SH : thioester

SNP : single nucleotide polymorphism

SPARES : surveillance et prévention de l'antibiorésistance en établissement de santé

SPILF : Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française

ST : sequence type

STEC : *E. coli* produisant des shiga-toxines

Te: thioestérase

TcpC : Toll/IL-1 receptor–containing protein C

TLR : Toll-like receptor

TRP : transient receptor potential

TRPV1 : transient potential receptor vanilloïde 1

UFC : unité formant colonie

UPEC : *Escherichia coli* uropathogènes

Upk : uroplakine

Usp : uropathogenic specific protein

VEGF: facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

wgMLST : whole genome MLST

wt : wild type

# Synthèse bibliographique

## I) Les infections urinaires

### A) Définitions et aspects cliniques

Les infections du tractus urinaire ou infections urinaires désignent la présence, symptomatique ou non, d'un micro-organisme dans l'urine. Différentes catégories cliniques sont distinguées dans la littérature.

#### 1) Les infections urinaires symptomatiques

Elles sont généralement classées en fonction de leur localisation. On distingue ainsi classiquement les infections touchant les voies urinaires basses, dont les cystites, des infections urinaires hautes ou pyélonéphrites qui atteignent le rein et de celles concernant les glandes annexes (prostatite).

D'autres dichotomies peuvent être utilisées dans la littérature. Ainsi les termes « compliquée » et « non compliquée » ou « simple » caractérisant l'infection peuvent être retrouvés, mais peuvent porter à confusion. L'infection compliquée peut en effet se référer à une susceptibilité particulière de l'hôte aux infections urinaires comme à la susceptibilité à une infection de déroulement plus sévère. D'autres classifications ont été proposées reposant à la fois sur des groupes de sévérité de l'infection à la présentation (de la cystite au choc uroseptique) et sur les facteurs d'hôte (facteurs de risque de récurrence ou de survenue d'infection grave) (Johansen et al. 2011). Les recommandations françaises établies par la Société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF) distinguent désormais les infections simples des infections à risque de complication, mettant l'accent sur les facteurs d'hôte associés à un risque d'engendrer une infection plus grave (Caron et al. 2018). Les facteurs de risque de complication retenus sont : les anomalies organiques ou fonctionnelles de l'arbre urinaire, le sexe masculin, la grossesse, l'immunodépression grave, l'insuffisance rénale chronique sévère ou l'âge (sujets âgés définis par un âge de plus de 75 ans ou de plus de 65 ans fragiles). Aux côtés de ces critères il existe des critères de gravité liés à la sévérité du tableau clinique, quel que soit le terrain prédisposant (choc septique, nécessité d'un drainage chirurgical...).

Le diagnostic associe la présentation clinique avec différents outils tels que la bandelette urinaire à la recherche de leucocyte estérase et de nitrate réductase (recommandée seule uniquement en cas de suspicion de cystite simple chez la femme chez laquelle elle présente une excellente valeur prédictive négative) et l'examen cyto bactériologique des urines (ECBU). L'interprétation de ce dernier prend en compte la présence d'une leucocyturie (au seuil généralement de  $10^4$  leucocytes/mL d'urine) et la

bactériurie dont le seuil dépend de la bactérie en cause et du sexe, tout en tenant compte du tableau clinique (Caron et al. 2018).

*a. Les cystites*

Les cystites correspondent à une infection limitée à la vessie. On retrouve des signes fonctionnels urinaires (SFU) : pollakiurie (besoins fréquents d'uriner), impériosité mictionnelle, miction douloureuse, brûlures mictionnelles, en l'absence de fièvre et de douleurs lombaires ainsi que d'autres symptômes (notamment parfois des signes vaginaux chez la femme) (Bruyère et al. 2008b). Parfois, des signes moins spécifiques sont également retrouvés comme une pesanteur et/ou douleur au niveau du bas ventre ou encore une hématurie.

Le diagnostic clinique est plus délicat chez les jeunes enfants ou les personnes âgées notamment ayant des difficultés à communiquer. Parfois, seuls des changements de comportements ou des modifications de la continence peuvent survenir, rendant le diagnostic différentiel avec les colonisations urinaires difficile (Rowe and Juthani-Mehta 2014; Stein et al. 2015).

Les cystites peuvent être récidivantes, en particulier chez la femme. Elles sont définies par la survenue durant 12 mois consécutifs d'au moins quatre épisodes de cystites (SPILF 2015).

*b. Les pyélonéphrites*

Les pyélonéphrites aiguës infectieuses correspondent aux infections du bassinet et du parenchyme rénal (haut appareil urinaire). Cliniquement, on retrouve une association de SFU (présents de manière non constante) avec des signes de l'atteinte tissulaire rénale : fièvre ; frissons ; douleurs des fosses lombaires le plus souvent unilatérales, spontanées ou provoquées par la palpation. Des signes digestifs (nausées, vomissements, diarrhées...) accompagnent parfois ces signes voire prédominent initialement (Bruyère et al. 2008c; SPILF 2015). Il peut s'agir d'une infection grave. Des complications aiguës sont possibles comme une suppuration locale (abcès périrénal) ou la généralisation de l'infection en un sepsis grave voire un choc septique.

*c. Les prostatites et infections urinaires masculines*

Les prostatites correspondent à l'inflammation de la glande prostatique. Lorsque son origine est bactérienne, les manifestations cliniques typiques regroupent des SFU, un syndrome infectieux (fièvre, frissons, syndrome parfois pseudo-grippal), des douleurs pelviennes ou périnéales et une prostate douloureuse au toucher rectal. Parfois une rétention aiguë d'urine est observée (Bruyère et al. 2008a). Des complications sont possibles : locales avec abcès de prostate, ou générales avec un sepsis.

Toute infection urinaire masculine peut potentiellement atteindre la prostate. Jusqu'à il y a peu, toute infection urinaire chez l'homme était prise en charge comme une prostatite. Les

recommandations françaises permettent aujourd'hui de moduler la prise en charge initiale des infections urinaires paucisymptomatiques chez l'homme pour lesquels l'atteinte prostatique est incertaine, mais non excluable de manière fiable cependant (SPILF 2015).

## 2) Les colonisations bactériennes ou bactériuries asymptomatiques

Elles correspondent à la présence de bactéries dans l'urine en l'absence de symptomatologie clinique. Elle peut être prolongée jusqu'à plusieurs années (Lindberg et al. 1975). La bactérie doit être retrouvée dans un ECBU réalisé dans des conditions d'hygiène correcte. Le seuil de  $10^5$  UFC/mL (unité formant colonie) est classiquement retenu pour les femmes enceintes et est étendu aux autres populations dans les recommandations américaines (Nicolle et al. 2005). En raison du risque de contamination par le microbiote intestinal, ces dernières recommandent par ailleurs la confirmation de la bactériurie asymptomatique chez la femme par un second ECBU mettant en évidence la même bactérie. La leucocyturie retrouvée ou non n'intervient ni dans la définition ni dans la décision de traitement, qui n'est indiqué que chez la femme enceinte et avant une chirurgie invasive programmée (Caron et al. 2018; Nicolle et al. 2019).

## 3) Urine et microbiote urinaire

Traditionnellement, l'urine était considérée comme un liquide normalement stérile et seul l'orifice urétral pouvait être contaminé par des populations polymicrobiennes en provenance du périnée. Cependant, comme dans d'autres sites longtemps considérés stériles, il semblerait qu'il existe également des communautés bactériennes physiologiques dans l'arbre urinaire, formant un microbiote urinaire parfois appelé « urobiome » (Whiteside et al. 2015). C'est notamment l'avènement de la biologie moléculaire qui a permis de mettre en évidence ces bactéries généralement non retrouvées en culture. Comme explications, on peut retrouver les conditions de culture usuelles des ECBU non adaptées à ces germes, qui peuvent cependant être retrouvés lorsque différents milieux et atmosphères sont utilisés dans une culture plus longue (Hilt et al. 2014). La sensibilité et les seuils des ECBU standard peuvent également permettre d'expliquer l'absence de culture de ces bactéries pouvant appartenir au microbiote urinaire, retrouvées en ensemençant un plus grand volume d'urine (Hilt et al. 2014). Gardons cependant en tête que lors d'une infection urinaire culture et analyse génomique du microbiote sont très généralement cohérentes et retrouvent l'uropathogène largement majoritaire (Willner et al. 2014). La notion de quantité

bactérienne est en effet très importante mais difficile à apprécier compte tenu de la possibilité de détecter des acides nucléiques appartenant à des bactéries non viables ou mortes.

Une des limites de la plupart des études concernant le microbiote urinaire est le mode de prélèvement utilisé pouvant induire des biais (Ackerman and Chai 2019). Le tractus urinaire est en effet très proche des sphères vaginales et digestives, hébergeant un important microbiome. Des prélèvements de miction en milieu de jet ou par sondage peuvent donc être facilement contaminés par les différentes flores qui peuvent coloniser la zone périnéale. Chez la femme, les microbiotes vaginal et urinaire se recoupent d'ailleurs largement (Thomas-White et al. 2018). Une étude utilise cependant des ponctions sus-pubiennes : les urines recueillies par ce moyen présentent des genres bactériens plutôt similaires mais en proportion variable comparées aux prélèvements par sondage (Wolfe et al. 2012). Il serait intéressant de connaître les quantifications absolues en bactéries dans ces différents prélèvements et les résultats des cultures en condition favorable. Parmi les genres bactériens les plus fréquemment retrouvés, on peut citer *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Corynebacterium*, *Anaerococcus*... mais avec de grandes disparités individuelles rendant difficile la description d'un microbiote « standard » même en tenant compte du genre ou de l'âge (Whiteside et al. 2015).

La perspective de l'existence d'un microbiote urinaire amène de très nombreuses interrogations : quelle est sa fonction ? (maturation de l'urothélium, du système immunitaire ? protection contre les composés toxiques, les pathogènes ?) et quels sont ces liens avec les états physiologiques et pathologiques de la sphère urinaire (voire au-delà) comme les infections urinaires, le cancer, les lithiases... ? Nous n'aborderons pas ces problématiques certes très intéressantes dans ce travail, mais nous nous focaliserons uniquement sur les infections urinaires symptomatiques et les bactériuries asymptomatiques présentées plus haut, qui, au contraire du microbiote, concernent uniquement la présence de bactéries viables et cultivables facilement en quantité généralement supérieure ou égale à  $10^5$ UFC/mL.

## B) Epidémiologie

### 1) Importance en médecine humaine

Les infections urinaires sont des infections très courantes qu'elles soient communautaires ou nosocomiales ; il s'agit d'une des infections bactériennes les plus fréquentes. On estime qu'elles toucheraient 150 millions de personnes par an à travers le monde (Harding and Ronald 1994) et près

d'une femme sur 2 (40%) y sera confrontée au cours de sa vie (Foxman 2010). En France, l'incidence annuelle s'élèverait à 4 à 6 millions de cas, soit 1 à 2% de l'activité des médecins généralistes, chiffre pouvant être sous-estimé, car le recueil n'est pas systématique (Elkharrat et al. 2007). Ce sont des infections qui ont un coût non négligeable lié aux traitements et arrêts de travail. En France, le coût moyen global de la prise en charge d'une femme consultant son généraliste pour des symptômes d'infections urinaires a été estimé à près de 70 euros, portant le coût total annuel dans cette population à 58 millions d'euros, dont la moitié supportée par l'assurance maladie (François et al. 2016).

L'incidence est très élevée dans la population des femmes jeunes, y compris en bonne santé, et estimée de 0,5 à 0,7 épisode aigu par an (Hooton et al. 1996). Ces épisodes sont fréquemment récurrents et source majeure d'inconfort et d'angoisse notamment, car liés à des situations favorisantes comme les rapports sexuels (Scholes et al. 2000). D'autres populations sont également concernées par les infections urinaires. Ainsi la survenue de ces dernières augmente indéniablement avec l'âge (Eriksson et al. 2010). La présence de malformations ou d'anomalies du tractus urinaire est également un facteur prédisposant et parfois révélé par la survenue d'une infection urinaire en pédiatrie (Hidas et al. 2015). Par ailleurs, les infections urinaires sont également très fréquentes chez les patients diabétiques ou immunodéprimés (Chuang et al. 2005; Britt et al. 2006; Hirji et al. 2012; Lenherr et al. 2016).

En milieu hospitalier, d'après l'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé réalisée en France de mai à juin 2017 (Santé publique France 2019), les infections urinaires représentent 28,5 % des infections nosocomiales, ce qui correspond dans cette étude à 1,48 % des patients hospitalisés touchés. Il s'agit du type d'infection le plus fréquent, souvent en lien avec la présence d'une sonde urinaire. Chaque jour de port d'une sonde urinaire augmenterait le risque de bactériurie de 3 à 10% (Foxman 2014). Le surcoût des infections urinaires nosocomiales serait estimé en France à environ 574 € par épisode (frais de laboratoire, d'explorations radiologiques, de chirurgie, d'antibiotiques), hors frais d'hospitalisation et coûts indirects (Defez et al. 2008).

La prévalence des bactériuries asymptomatiques est également assez élevée et concernerait près de 3,5% de la population. La fréquence augmente indéniablement avec l'âge et est plus élevée en cas de sondage urinaire (Colgan et al. 2006; Foxman 2014).

## 2) Epidémiologie microbienne

Les infections urinaires sont avant tout des infections bactériennes, les levures étant retrouvées plus rarement dans des contextes de colonisation sur matériel, d'immunodépression ou d'antibiothérapie large spectre préalable. Les entérobactéries et plus précisément *Escherichia coli* sont les plus fréquemment isolées, mais d'autres espèces telles que *Staphylococcus saprophyticus* notamment chez la femme jeune ou encore *Pseudomonas aeruginosa*, suite par exemple à un traitement antibiotique large spectre, peuvent être rencontrées (Figure 1)(Flores-Mireles et al. 2015).

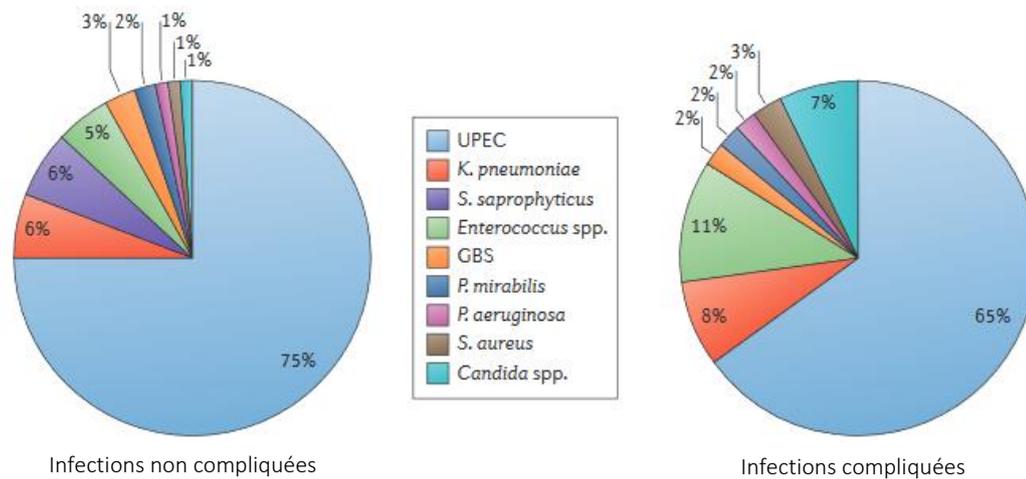


Figure 1 : Répartition des différents pathogènes isolés d'infections urinaires. D'après (Flores-Mireles et al. 2015). UPEC : *E. coli* uropathogènes. GBS : *Streptocoques du groupe B*

*E. coli* est isolée dans plus de 70% des infections communautaires (SPILF 2015) et dans près de 50% des infections nosocomiales en France ce qui en fait le premier germe retrouvé (Santé publique France 2019). Devant la très large sur-représentation de *E. coli* (UPEC pour *E. coli* uropathogènes) comme cause d'infections urinaires, nous nous focaliserons sur cette bactérie en particulier pour la suite de la présentation.

### 3) Antibiorésistance

Les résistances aux antibiotiques de *E. coli* ont augmenté au cours des deux dernières décennies en France et dans le monde entier que ce soit en ville ou à l'hôpital. Elles sont essentiellement acquises par transfert horizontal de gène, notamment via les plasmides comme c'est le cas des enzymes hydrolysant les bêta-lactamines ; ou bien via l'accumulation de mutations chromosomiques impliquées par exemple dans la résistance aux fluoroquinolones. On remarque une augmentation des souches de *E. coli* résistantes aux antibiotiques classiquement utilisés dans la prise en charge des infections urinaires notamment sévères (comme les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) ou les fluoroquinolones) (Figure 2). En revanche, que ce soit en ville ou à l'hôpital, il est rassurant de

constater une sensibilité de plus de 98% des souches de *E. coli* à deux des molécules de premier recours pour le traitement des cystites : fosfomycine et nitrofurantoïne (Santé Publique France 2020, 2021).

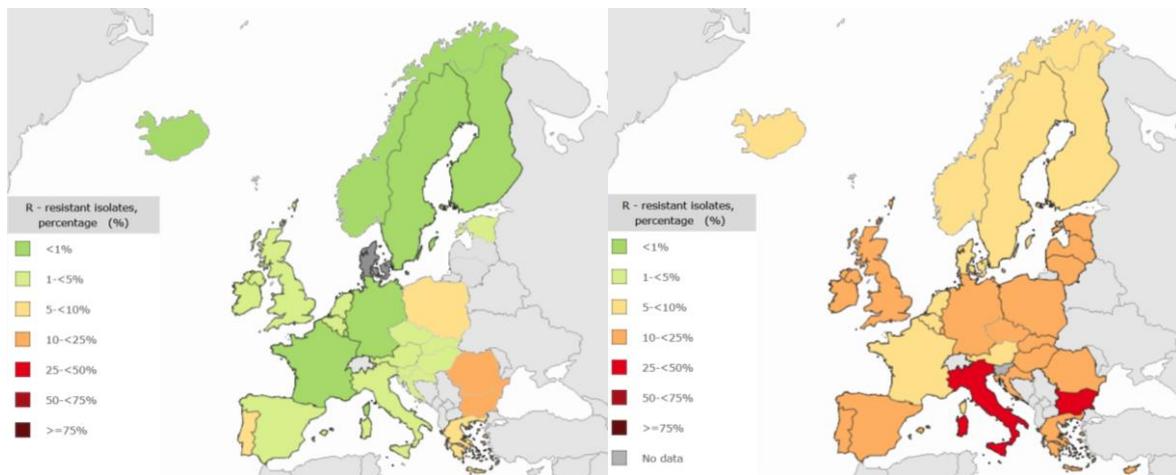


Figure 2 : Résistance des *E. coli* aux antibiotiques. Proportion d'isolats de *E. coli* résistants aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération dans les pays participant au recueil de l'ECDC sur des isolats à l'origine d'infections invasives (bactériémies) en 2002 (à gauche) et 2019 (à droite). D'après (European Centre for Disease Prevention and Control 2021).

La mission SPARES (surveillance et prévention de l'antibiorésistance en établissement de santé) qui collige les données d'antibiorésistance d'environ la moitié de l'effectif hospitalier français (soit plus de 200 000 souches de *E. coli*) a retrouvé une résistance aux C3G à hauteur de 9% et aux fluoroquinolones de 19% en 2019 (Santé Publique France 2021). Les *E. coli* représentent près de la moitié des EBLSE (entérobactéries productrices de BLSE, bêta-lactamase à spectre étendu, mécanisme de résistance aux C3G) et 20% des bactéries productrices de carbapénémases (hydrolysant donc la quasi-totalité des antibiotiques de la famille des bêta-lactamines), même si en nombre absolu de cas cela reste encore anecdotique. A noter que dans cette vaste étude deux tiers des EBLSE sont isolées d'urines. Dans l'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, la résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération avait presque doublé de 2006 à 2012 mais est restée stable en 2017 avec près de 15% de *E. coli* producteurs de BLSE (Santé publique France 2019).

La résistance de *E. coli* aux antibiotiques est aussi présente en ville, comme le montre une étude du réseau ville-ONERBA (Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques) réalisée sur des bactéries issues d'infections urinaires (Martin et al. 2016). La proportion de souches productrices de BLSE (Bêta-lactamase à spectre étendu), et donc résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, est estimée à 3,3%, proportion qui augmente avec l'âge. Ces chiffres sont confirmés plus récemment par la mission PRIMO (surveillance et prévention de la résistance aux antibiotiques et des infections associées aux soins en soins de ville et secteur médico-

social) collectant des données épidémiologiques d'ECBU de ville (Santé Publique France 2020). Le rapport fait également mention d'un plus fort taux de résistance chez les patients vivants en EPHAD qu'à domicile (chiffre stable de 8,7% de *E. coli* BLSE versus 3% ; pourcentage en baisse de 19,1% de résistance aux fluoroquinolones versus 11,4% en ville).

Notons que les *E. coli* sont potentiellement des bactéries zoonotiques, avec un pouvoir pathogène chez l'animal (colibacillose aviaire, infections urinaires chez le chien ou le chat...) et que l'usage des antibiotiques concerne également la médecine vétérinaire. Les souches impliquées dans les pathologies vétérinaires sont d'ailleurs parfois les mêmes ou très proches de celles impliquées dans les infections humaines (notamment les souches d'UPEC Homme-animal et les souches de colibacillose aviaire et certains UPEC humains), suggérant sinon un réservoir animal tout du moins une transmission possible (Johnson et al. 2008a; Jørgensen et al. 2019). La surveillance de l'antibiorésistance doit donc également s'inscrire au-delà de la simple médecine humaine et prendre en compte également animaux et environnement, illustré par le concept « One Health ». D'après les données vétérinaires collectées par le réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, la résistance aux fluoroquinolones est en diminution (RESAPATH 2020). La résistance aux C3G utilisées en médecine vétérinaire est inférieure à 5% des souches de *E. coli* et a également diminué au cours des dix dernières années, reflet sans doute en partie des efforts de meilleurs prescription et usage des antibiotiques.

Les mécanismes de résistances aux différentes classes d'antibiotiques sont de plus souvent associés, pouvant alors réduire drastiquement le panel des thérapeutiques utilisables notamment pour les infections compliquées. Le risque à terme est l'apparition de réelles impasses thérapeutiques, y compris pour des infections aussi banales et fréquentes que les infections urinaires, notamment dans le cadre d'infections nosocomiales ou de précédentes antibiothérapies. Dans son rapport de 2019, le centre de contrôle des pathologies américain (CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*) a ainsi classé les *E. coli* résistants aux carbapénèmes comme menace urgente et producteurs de BLSE comme menace sérieuse (Centers for Disease Control and Prevention (U.S.) 2019). De plus, les gènes codant pour certaines résistances comme les BLSE ou carbapénémases sont fréquemment extrachromosomiques et donc transférables ce qui permet leur dissémination au-delà de la seule espèce *E. coli*.

C) Qu'est-ce qu'une UPEC ?

## 1) L'espèce *E. coli*, une espèce très variable

*E. coli* est une espèce classée comme une gamma-Protéobactérie de la famille des entérobactéries. Elle est caractérisée par une importante variabilité. Il s'agit d'une bactérie commensale du tube digestif d'animaux à sang chaud. Chez l'Homme, c'est même la bactérie aérobie-anaérobie facultative prédominante du microbiote intestinal (Kaper et al. 2004). Cependant, suite à l'acquisition de facteurs de virulence, elle peut également être à l'origine d'infections : (i) des infections extra-intestinales (*E. coli* pathogènes extra-intestinaux, ExPEC) au premier rang desquelles les infections urinaires (UPEC) mais également des sepsis, des méningites néonatales (*E. coli* des méningites néonatales, NMEC) ou encore la colibacillose aviaire (*E. coli* pathogènes aviaires, APEC) ; (ii) des infections intestinales notamment des diarrhées (*E. coli* entéro-pathogènes, EPEC ; entérotoxinogènes, ETEC ; entéro-invasifs, EIEC...) pouvant aller jusqu'à des syndromes hémolytiques et urémiques (*E. coli* entérohémorragiques, EHEC) (Croxen and Finlay 2010). L'existence de ces différents pathovars s'explique notamment par une importante plasticité du génome de *E. coli* qui conduit à l'existence de souches très diverses sur le plan génétique. Elle est liée à l'acquisition de facteurs de virulence ou d'adaptation à différents environnements qui sont notamment portés par des éléments génétiques mobiles tels que des plasmides, des phages, des transposons ou encore des îlots génomiques qui ont été acquis par transfert horizontal (Figure 3). Ainsi le *core genome* (qui correspond à la partie constante du génome présente chez tous les *E. coli*) ne représente qu'un sixième du *pan genome* (qui est le répertoire total des gènes pouvant être présents dans l'espèce *E. coli*), et environ la moitié des gènes d'une souche (Croxen and Finlay 2010). L'existence de recombinaisons, de pertes de gènes et de mutations (activatrices ou inactivatrices) permet également de renforcer cette diversité des souches de *E. coli*, de même que d'importantes variabilités dans la régulation et l'expression de ces différents facteurs.

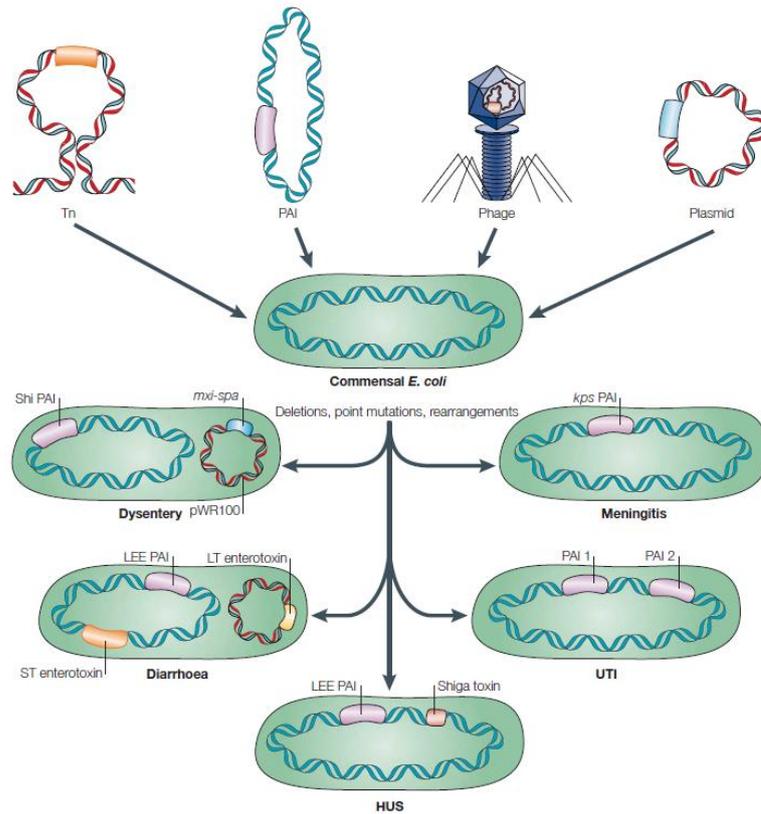


Figure 3 : Contribution des éléments génétiques mobiles à l'évolution des *E. coli* pathogènes. Les facteurs de virulence peuvent être portés par différents éléments génétiques mobiles tels que des transposons (Tn) (par exemple la toxine thermostable ST des ETEC à l'origine de diarrhées), îlots de pathogénicité (PAI) (locus d'effacement des entérocytes LEE des EHEC à l'origine de syndromes hémolytiques et urémique (HUS)), bactériophages (comme la shiga-toxine des EHEC) ou plasmides (toxine thermolabile LT des ETEC). Des délétions, mutations ponctuelles et réarrangements peuvent également contribuer à la virulence. L'ensemble de ces variations génétiques explique la présence de différents pathovars. D'après (Kaper et al. 2004).

## 2) Phylogénie des UPEC

- a. Les UPEC appartiennent majoritairement au groupe phylogénétique B2 doté de capacités de virulence et de colonisation digestive

Les *E. coli* sont divisés en huit groupes phylogénétiques majeurs : A, B1, B2, C, D, E, F et G. Ces groupes phylogénétiques peuvent être facilement définis grâce à un algorithme sur la base de présence/absence de gènes spécifiques par PCR multiplex et plus récemment à partir des séquences des génomes. Ils reflètent la similarité de la partie constante du génome de *E. coli* ou *core genome* (Jaureguy et al. 2008; Clermont et al. 2013, 2019)(Figure 4).

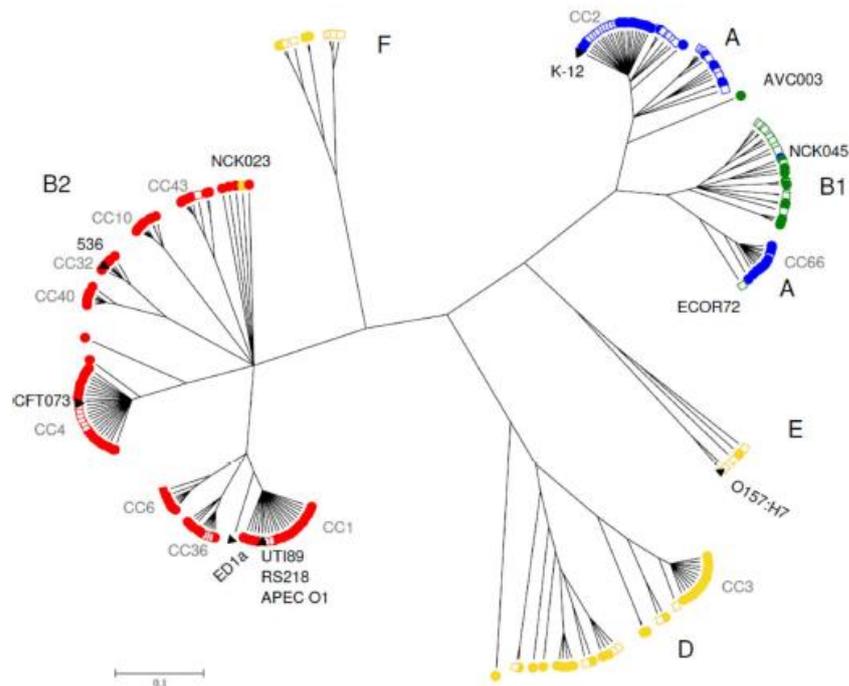


Figure 4 : Groupes phylogénétiques de *E. coli*. Analyse phylogénétique par MLST (multilocus sequence typing) de 161 souches isolées de bactériémies (cercles), 67 souches de la collection ECOR (*E. coli* collection reference strains)(carrés) et 7 souches de référence (triangles), définissant les 6 phylogroupes majoritaires, les groupes C et G ayant été décrit plus récemment. D'après (Jaureguiy et al. 2008).

Comme la plupart des *E. coli* pathogènes extra-intestinaux, les *E. coli* isolés d'infections urinaires appartiennent majoritairement au groupe phylogénétique B2 (Ferjani et al. 2012; Kudinha et al. 2013a). On notera que certaines études épidémiologiques chinoises montrent une prédominance de souches du groupe D, probablement liée à un particularisme régional (Zhao et al. 2009; Luo et al. 2012; Wang et al. 2014b).

Les souches du groupe phylogénétique B2 possèdent souvent des gènes codant pour des facteurs de virulence conférant un avantage dans la relation hôte-pathogène, notamment durant les infections urinaires. Par exemple, leur génome renferme des gènes codant pour des toxines entraînant des dommages tissulaires lors d'infections ou encore pour des systèmes de captation de nutriments perfectionnés pour favoriser leur croissance au détriment de l'hôte (notamment en fer). Durant l'évolution, plus que la virulence, ce sont probablement de grandes capacités de colonisation et de persistance au niveau de leur réservoir digestif qui expliquent leur émergence grâce à l'accumulation de ces mêmes facteurs pouvant être considérés comme des facteurs d'adaptation (adhésion, métabolisme, toxines...) (Le Gall et al. 2007; Denamur et al. 2021). Ainsi, ces souches B2 sont associées à une pauci-clonalité au niveau digestif au moment de l'infection urinaire, montrant leurs capacités de colonisation de cette niche. Elles sont aussi plus fréquemment retrouvées au niveau

digestif chez les femmes souffrant d'infections urinaires que celles n'en souffrant pas (Moreno et al. 2008, 2009).

*b. Les ST majoritaires des UPEC*

Au sein de chaque phylogroupe il existe une répartition clonale des souches en différents sous-groupes. Historiquement c'est le sérogroupage des antigènes O, H et K qui permettait cette distinction. Depuis cette classification a été supplantée par l'utilisation des *sequence types* (ST) qui établissent des groupes à partir des allèles de gènes de ménages (*multilocus sequence typing* ; MLST). Les profils peuvent être définis avec différents algorithmes dont le plus utilisé et auquel nous nous référons dans cette présentation est celui proposé par l'université de Warwick (Wirth et al. 2006). Des profils proches peuvent être regroupés en complexes clonaux. Cette classification reste le moyen le plus utilisé pour décrire une souche et savoir à quel clone elle appartient, même si avec l'avènement du séquençage des génomes entiers il est également possible de définir des ST sur le *core genome* ou le génome entier (*whole genome MLST* ; wgMLST) (Denamur et al. 2021). Au sein d'un même ST il subsiste une variabilité plus ou moins importante (SNP, gènes de virulence et éléments génétiques mobiles variables). Parmi les UPEC, les études épidémiologiques retrouvent de très nombreux ST différents mais seul un petit nombre (3-4) de ST regroupe la très grande majorité des souches d'infections urinaires. Sans vouloir ni pouvoir être exhaustif nous introduirons ci-dessous ces principaux ST qui présentent des caractéristiques différentes.

ST131

*E. coli* ST131 appartient au phylogroupe B2 et comporte 3 clades (A,B,C) (Pitout and Finn 2020). Depuis les années 2000 les *E. coli* ST131 du clade C ont largement émergé et représentent une cause importante d'infections extra-intestinales, y compris des infections urinaires (Kallonen et al. 2017; Duprilot et al. 2020). Leur notoriété est également liée au lien avec l'antibiorésistance : les *E. coli* ST131 sont généralement résistants aux fluoroquinolones par la survenue d'une mutation au cours de l'évolution et une importante proportion est également porteuse d'un plasmide codant pour une BLSE, les rendant multi-résistants (Zakour et al. 2016). C'est désormais une des principales sources d'UPEC BLSE en France (Birgy et al. 2020). Les clés de leur dissémination réussie sont mal connues mais reposent vraisemblablement sur une combinaison de différents facteurs : virulence, capacités de colonisation préservées malgré l'antibiorésistance, pression de sélection des antibiotiques, importante variabilité et diversité des souches et allèles... (Johnson et al. 2016; McNally et al. 2019; Pitout and Finn 2020).

ST95 et ST73

Autres membres du phylogroupe B2, les *E. coli* ST73 et ST95 sont parmi les majoritaires des UPEC et étaient déjà en place lors de l'émergence des *E. coli* ST131 (Fibke et al. 2019). Au contraire des *E. coli* ST131 clade C, ils sont généralement caractérisés par une absence d'antibiorésistance. Ils comportent également plusieurs sous-groupes. Au sein du ST95, il n'y a pas que des souches d'UPEC humains : ces *E. coli* sont également à l'origine de méningites néonatales et de colibacillose aviaire, soulignant le potentiel zoonotique de certains sous-groupes (Gordon et al. 2017; Jørgensen et al. 2019).

#### Autres sequence types

Il existe d'autres ST fréquemment retrouvés, notamment au sein du phylogroupe B2 les souches du ST127 (caractérisées par une absence d'antibiorésistance comme le ST95 et ST73) (Denamur et al. 2021). Le ST69 appartenant au phylogroupe D est également un ST prévalent, volontiers associé à des résistances aux anti-microbiens. Il est également intéressant de noter l'existence au sein des *E. coli* ST141 (phylogroupe B2) de souches hybrides entre UPEC et STEC (*E. coli* produisant des shiga-toxines) récemment décrits. Preuve de la plasticité du génome des *E. coli*, l'acquisition par ces souches d'éléments génétiques mobiles tels que le prophage *stx* associé aux STEC confère une pathogénicité à la fois à type d'infections urinaires et de diarrhées (Gati et al. 2019).

### 3) Les facteurs de virulence associés aux UPEC

La physiopathologie des infections urinaires fait intervenir à la fois des facteurs d'hôtes, rendant certaines catégories de population plus sujettes aux infections urinaires ainsi que certains comportements, mais également des facteurs bactériens expliquant une virulence accrue de certaines souches. Contrairement à d'autres *E. coli* pathogènes, les UPEC ne sont pas définis sur la présence d'un ou plusieurs facteurs de virulence en particulier, mais sur leur isolement dans l'urine d'un patient symptomatique au niveau urinaire (Schreiber et al. 2017b). Il n'existe ainsi pas de profil type strict des UPEC : un portage au niveau digestif de souches potentiellement urovirulentes peut être observé sans apparition d'infection urinaire, preuve de l'importance également de la susceptibilité de l'hôte. La survenue d'une infection peut être envisagée comme la rencontre entre un hôte de susceptibilité particulière et une bactérie de pathogénicité et d'adaptation correspondantes dans un modèle de type clé-serrure (Schreiber et al. 2017b). Plus que la présence de gènes codant pour des facteurs de virulence, l'expression de ces gènes voire l'expression et la régulation de fonctions conservées telles qu'impliquées dans le métabolisme pourraient être

primordiales (Schreiber et al. 2017a). Cependant, certains facteurs de virulence sont tout de même volontiers retrouvés plus fréquemment chez des souches de *E. coli* isolées d'infections urinaires. Des mécanismes physiopathologiques clés sont impliqués (Flores-Mireles et al. 2015) :

- L'adhérence aux épithéliums du tractus urinaire
- La production de toxines entraînant des dommages cellulaires
- Les facteurs permettant l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte
- Les systèmes impliqués dans la croissance de la bactérie dans le milieu urinaire

Sans vouloir ni pouvoir être exhaustif, l'importance de certains facteurs de virulence dans la physiopathologie des infections urinaires va être approfondie dans cette partie.

#### a. Les pili ou fimbriae

Un des éléments clés à chaque étape de l'infection urinaire est l'adhérence bactérienne aux épithéliums du tractus urinaire (Flores-Mireles et al. 2015). Les pili et leurs adhésines sont les acteurs majeurs impliqués.

Les *chaperone usher pathway* (CUP) pili sont une grande et importante famille de pili des bactéries à Gram négatif. Ce sont de longues structures protéiques extracellulaires assemblées par un mécanisme particulier (*chaperone-usher*, apparié par les chaperones) qui leur a donné leur nom (pour revue voir (Waksman and Hultgren 2009)). Cette famille comprend quatre pili de *E. coli* intéressants dans la colonisation urinaire et bien caractérisés : pili de Type 1, pili F17-like, pili P associés aux pyélonéphrites (Pap) et pili Fim-like plus récemment décrits (Klein and Hultgren 2020)(Figure 5). Ils sont constitués d'une tige rigide et possèdent à leur extrémité distale des adhésines spécifiques du type de pilus (FimH, UclD, FmIH et PapG) qui reconnaissent des carbohydrates et permettent l'adhésion sur une cible cellulaire spécifique (Figure 5).

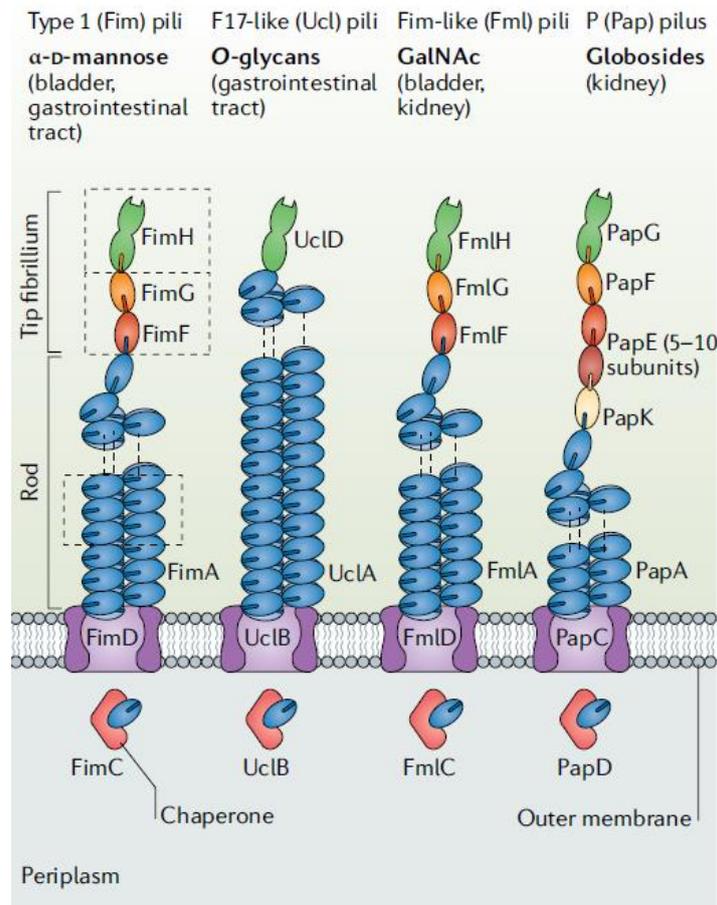


Figure 5 : Les quatre principaux types de pili impliqués dans les infections urinaires. Ce sont des CUP pili dont les sous-unités sont assemblées grâce à des chaperones périplasmiques. De très nombreuses sous-unités identiques forment les tiges rigides (rods). La pointe (tip) est terminée par des adhésines composées de deux sous-unités et qui assurent la reconnaissance spécifique de différents sucres, conditionnant la cible cellulaire de ces différents pili. D'après (Klein and Hultgren 2020).

Les pili de Type 1 sont essentiels pour la colonisation de la vessie en modèle murin par leur reconnaissance des uroplakines mannosylées de l'urothélium et également des intégrines  $\beta 1$  et  $\alpha 3$  (Eto et al. 2007; Spaulding and Hultgren 2016). Ils permettent l'adhésion, mais également l'invasion des cellules urothéliales, en favorisant le réarrangement de l'actine de la cellule cible et l'internalisation bactérienne (Martinez et al. 2000). Ils pourraient également être impliqués dans la colonisation digestive par les uropathogènes d'où un intérêt majeur (Spaulding et al. 2017). Les pili de Type 1 sont présents à la fois chez des souches commensales digestives, mais également chez des souches isolées d'infections urinaires (Hashemizadeh et al. 2017). Jusqu'à 100% des souches urinaires de certaines études portent le gène *fimH* (Tabasi et al. 2016). L'expression des pili de Type 1 est finement régulée par un système dit « inversion de phase » qui repose sur l'orientation du promoteur *fimS*, elle-même soumise à de nombreux facteurs bactériens ou environnementaux y compris durant l'infection urinaire (Schwan 2011). Notamment, bien que la croissance planctonique dans l'urine humaine diminue l'expression des pili de Type 1, cet effet est dépassé par une induction

de l'expression de ces pili lors de l'attachement aux cellules épithéliales de la vessie (Greene et al. 2015). De plus, la force mécanique appliquée sur le pilus de type 1 renforce la liaison à son ligand, propriété intéressante quand on sait que l'adhésion à la paroi vésicale est soumise notamment au flux urinaire (Aprikian et al. 2011).

Les pili Pap ou P fimbriae sont plus spécifiquement associés aux uropathogènes. Leur adhésine reconnaît les glycosphingolipides de l'épithélium rénal avec une spécificité dépendant de l'allèle du gène *papG* (*papGI*, *papGII* or *papGIII*) (Lane and Mobley 2007). Plus qu'un moyen d'adhésion aux cellules rénales, ils pourraient également contribuer à l'échappement à la réponse immune de l'hôte. Il a en effet été démontré en modèle murin que, lors d'infections avec des *E. coli* porteurs de P fimbriae, les taux d'IgA (immunoglobuline A) dans l'urine étaient plus faibles, en lien avec une diminution de l'expression du transporteur d'IgA (Rice et al. 2005). On retrouve les gènes de l'opéron Pap de manière plus importante chez les souches de pyélonéphrites que de cystites ou de bactériuries asymptomatiques (Er et al. 2015; Tabasi et al. 2016). De plus, de manière intéressante, la sévérité de la pathologie urinaire induite par la souche semble liée à l'allèle de *papG*. En effet, PapGII est plus fréquemment retrouvé dans les souches de pyélonéphrites tandis que PapGIII est rencontré préférentiellement dans les cystites (Johnson et al. 1998; Kudinha et al. 2013b).

Les fimbriae F17-like sont des pili associés aux ExPEC (et notamment aux UPEC, avec une forte prévalence chez des souches d'infections récurrentes) mais proches génétiquement de pili de pathogènes intestinaux. Ils permettent une adhésion importante sur les cellules intestinales et ainsi la colonisation intestinale et donc la formation du réservoir digestif par les UPEC, étape préalable importante avant l'infection urinaire (Spaulding et al. 2017).

Les pili Fim-like ou pili F9 sont d'autres pili associés aux UPEC proches de pili de type 1 (Wurpel et al. 2014). Leur cible est cependant légèrement différente ce qui leur permet l'adhésion, non pas sur l'urothélium sain comme les pili de type 1, mais sur l'épithélium de la vessie inflammée dont le profil des sucres exprimés est différent, notamment lors d'une infection chronique (Conover et al. 2016).

Ces différents pili forment donc un répertoire complexe qui permettent l'adhésion bactérienne au sein de différents réservoirs.

#### *b. Les sidérophores*

Parce que le système immunitaire tend à séquestrer les métaux pour ralentir la croissance bactérienne, notamment au niveau de l'urine vésicale, des systèmes performants de captation du fer sont également considérés comme des facteurs de virulence des uropathogènes (Subashchandrabose and Mobley 2015a). Le fer est en effet essentiel à différents processus du

métabolisme bactérien. Les mécanismes d'acquisition du fer sont souvent multiples chez les UPEC : transporteurs de fer ferreux, récepteurs membranaires à l'hème, sidérophores... (Subashchandrabose and Mobley 2015a, 2015b).

Les sidérophores sont des chélateurs du fer. Ils capturent le fer ferrique couplé à des protéines telles que la transferrine puis s'attachent à un récepteur membranaire qui permet l'internalisation du complexe sidérophore-métal puis le relargage au niveau cytoplasmique. *E. coli* produit jusqu'à quatre types de sidérophores : la yersiniabactine, l'aérobactine, l'entérobactine et les formes glycosylées de cette dernière, les salmochélines (Subashchandrabose and Mobley 2015a). L'entérobactine est produite par tous les *E. coli*, contrairement aux autres qui appartiennent au répertoire variable et sont codées par des îlots de pathogénicité portés notamment par des souches du groupe B2 (répertoire le plus varié) comme les souches associées aux infections urinaires. Au contraire de l'entérobactine, la yersiniabactine, l'aérobactine et les salmochélines ne sont pas reconnues et neutralisées par la lipocaline-2 de l'hôte qui est sécrétée lors de la séquestration du fer par l'immunité innée « nutritionnelle » (Subashchandrabose and Mobley 2015a). D'un point de vue chimique il s'agit de métabolites secondaires de bas poids moléculaire qui appartiennent à deux grandes familles : (i) les hydroxamates pour l'aérobactine (ii) les peptides non ribosomaux (NRP) ou hybrides polykétides-peptides non ribosomaux (PK-NRP) pour les trois autres (Figure 6).

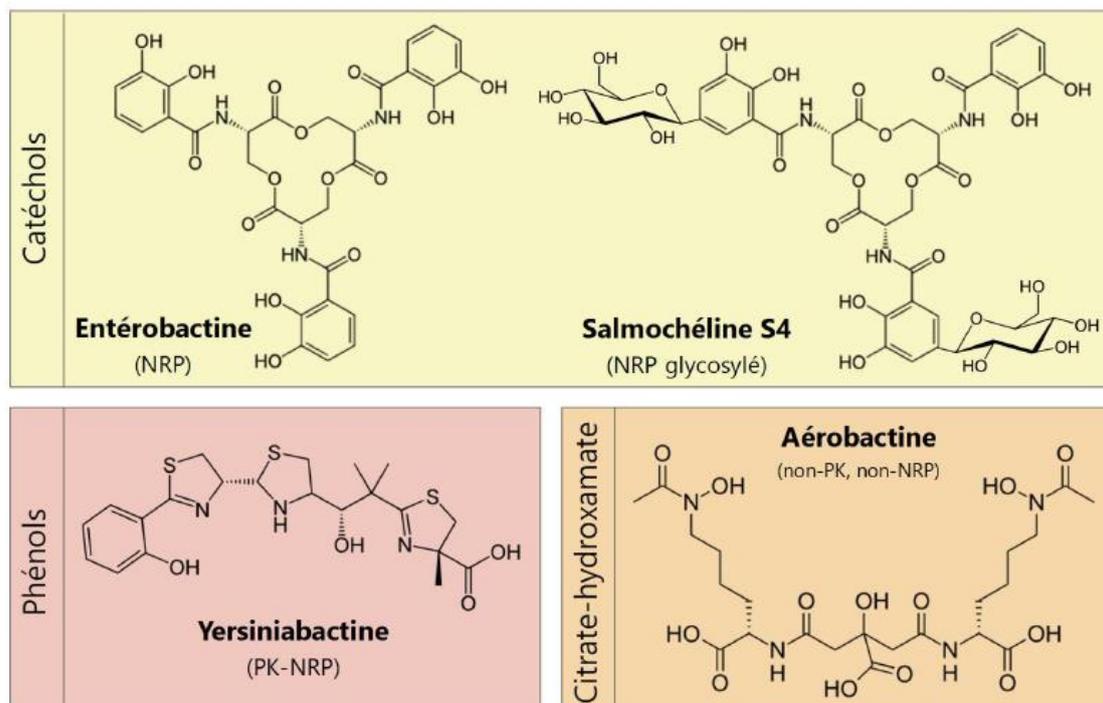


Figure 6 : Structure des sidérophores retrouvés chez *E. coli*. D'après (Garénaux et al. 2011; Martin et al. 2017).

Les gènes impliqués dans la biosynthèse ou codant pour les récepteurs de ces sidérophores sont largement exprimés au sein du tractus urinaire lors d'une infection (Hagan et al. 2010). D'autre part, l'aérobactine est plus volontiers associée à des souches provoquant des infections compliquées, comme des pyélonéphrites ou des prostatites qu'à des cystites (Ruiz et al. 2002).

### c. Les toxines

#### L'hémolysine A

Les *E. coli* uropathogènes montrent également une certaine virulence en raison de la production de toxines. La production d'hémolysine A ou  $\alpha$ -hémolysine (HlyA) est un exemple impliqué à la fois dans la formation de dommages cellulaires et d'évasion immunitaire. *hlyA* est largement présent chez les UPEC mais est plus souvent associé aux souches de pyélonéphrites qu'aux *E. coli* isolés dans les cystites ou bactériuries asymptomatiques (Tarchouna et al. 2013; Tabasi et al. 2016).

Par oligomérisation en présence de calcium, HlyA s'intègre dans la membrane de la cellule de l'hôte et forme des pores (Ristow and Welch 2016). A de fortes concentrations, la lyse cellulaire consécutive peut promouvoir la croissance bactérienne par relargage de nutriments et de fer, utiles pour les UPEC extracellulaires. A doses sublytiques, l'induction d'une activité protéolytique est retrouvée non seulement sur les cellules urothéliales (conduisant à l'exfoliation), mais également sur les macrophages, ce qui permet d'altérer la réponse immunitaire (Dhakal and Mulvey 2012). Cela pourrait apporter un avantage notamment pour les UPEC des communautés bactériennes intracellulaires, dans lesquelles le gène *hlyA* est hautement exprimé (Reigstad et al. 2007; Justice and Hunstad 2012). De manière plus précise, l'action de HlyA induirait l'activation de caspases 1 et 4 et de la voie de l'inflammasome NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*) et ainsi la mort par apoptose (Nagamatsu et al. 2015). Une hyperproduction de HlyA réduit ainsi la charge bactérienne vésicale en modèle murin d'infection. Cependant, pour éviter ces conséquences délétères sur la bactérie, l'expression de *hlyA* est finement régulée par le système à deux composantes CpxRA ce qui permet de favoriser la persistance des UPEC (Nagamatsu et al. 2015). De plus, via l'inflammasome et l'activation de la caspase 1 notamment, HlyA induit aussi la production d'IL1- $\beta$  par les macrophages et contribue ainsi à la réponse de l'hôte (Murthy et al. 2018). Ces effets sont là encore intimement liés au niveau de production de HlyA (Murthy et al. 2019).

## CNF1

Le facteur de nécrose cytotoxique 1 (CNF1) est une autre toxine produite par certains uropathogènes. Chez les UPEC, le gène *cnf1* codant pour cette toxine est systématiquement retrouvé associé à l'opéron *hlyCABD*. La présence du gène *cnf1* est associée avec le groupe phylogénétique B2 des *E. coli* et plus fréquente dans les souches isolées d'urosepsis ou d'infections urinaires que dans les souches fécales (Dubois et al. 2010; Kudinha et al. 2013a).

CNF1 est une toxine qui interagit avec les Rho-GTPases RhoA, Cdc42 et Rac en catalysant la désamidation d'une glutamine ce qui conduit à leur activation puis potentiellement à leur dégradation (Welch 2016). Les voies de signalisation des Rho-GTPases sont impliquées dans la structure du cytosquelette (Welch 2016). CNF1 permet ainsi d'augmenter l'internalisation des UPEC au sein des cellules urothéliales (Doye et al. 2002; Landraud et al. 2004). En modèle d'infection urinaire, la présence de CNF1 augmenterait la réponse inflammatoire dont témoigne l'œdème vésical (Smith et al. 2008). CNF1 induit en effet l'activation de l'inflammasome via NLRP3 ce qui entraîne l'augmentation de la sécrétion d'IL1- $\beta$  (Dufies et al. 2021). Lors d'une bactériémie, CNF1 présente un également un effet pro-inflammatoire mais contrecarré par HlyA auquel il est systématiquement associé, par un mécanisme qui semble mal connu (Diabate et al. 2015; Boyer and Lemichez 2015). De manière intéressante, via une action sur RhoC, CNF1 pourrait également favoriser l'angiogenèse en augmentant la sécrétion du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) par des cellules vésicales cancéreuses (Guo et al. 2020).

## Des génotoxines

Usp

*Uropathogenic specific protein* (Usp) a été découverte au début des années 2000 et doit son nom à une forte association avec les souches uropathogènes (Bauer et al. 2002; Kanamaru et al. 2003).

Usp présente une homologie avec les pyocines de *Pseudomonas aeruginosa* et les colicines nucléases, suggérant que cette protéine pourrait elle aussi être une bactériocine (Parret and De Mot 2002). Les ORF (*open reading frame* ; cadre de lecture ouvert) en aval de *usp* nommés *imu1* à *imu3* présentent des motifs caractéristiques des protéines d'immunités des colicines nucléases.

L'activité nucléase de Usp a été confirmée après purification par deux équipes différentes (Zaw et al. 2013; Nipic et al. 2013). Cependant, aucune des deux équipes n'a mis en évidence d'activité toxique sur les souches de *E. coli* testées, suggérant un spectre d'action différent. Nipic *et al.* font ainsi l'hypothèse d'une activité sur les cellules eucaryotes, et non les bactéries (Nipic et al. 2013).

Appliquée sur des cellules primaires endothéliales, Usp entraîne une modification de la forme des cellules, ainsi qu'une diminution de viabilité (Nipic et al. 2013). L'ADN des cellules est endommagé comme en témoigne un test comète positif. L'action génotoxique induit les caspases et des stigmates d'apoptose sont observés. De manière intéressante, l'activité génotoxique est exacerbée par la présence d'Imu2 purifié, qui présente également une activité génotoxique seul, tandis que Imu3 réduit cette activité, suggérant un rôle protecteur ou d'immunité. Des études complémentaires ont ainsi permis de montrer qu'Imu3 avait une activité protectrice de l'ADN en s'y fixant de manière non spécifique, sans former de complexe avec Usp mais en empêchant l'accès à l'ADN (Črnigoj et al. 2014). Elle permet ainsi une protection également contre la colicine E7 (Črnigoj et al. 2014).

La *trafficking* et les cibles cellulaires préférentielles de Usp ne sont pas connues. Cependant, *in vivo* la présence du gène *usp* augmente de manière significative la colonisation dans un modèle murin de pyélonéphrite, au contraire des gènes codant pour les trois protéines associées (Yamamoto et al. 2001). Il semble donc que la production de cette génotoxine puisse en partie jouer un rôle sur la virulence ou la colonisation au cours d'une infection urinaire. On ne connaît cependant ni les conséquences à long terme sur les cellules ni les mécanismes à l'origine de cette potentielle exacerbation de virulence lors de l'infection urinaire.

#### CDT

La toxine de distension cytoléthale (*cytolethal distending toxin* CDT) est une toxine produite par de nombreux bacilles à Gram négatif dont *E. coli* chez qui cinq variants ont été caractérisés (Taieb et al. 2015). Elle comporte trois sous-unités formant un complexe ternaire : CdtA et C nécessaires pour la liaison aux récepteurs et l'entrée de CdtB dans la cellule eucaryote cible ; et CdtB, très conservée et qui possède une activité nucléase (Taieb et al. 2016). Elle est très proche de la toxine typhoïde de *Salmonella enterica* serovar Typhi qui comporte également une sous-unité CdtB. Après endocytose, CdtB subit un transport rétrograde jusqu'au noyau où elle va exercer son activité génotoxique (DiRienzo 2014). CdtB présente des similarités avec la deoxyribonucléase I et induit des dommages à l'ADN. Ainsi des cassures double-brins sont retrouvées *in cellulo* (Guerra et al. 2005). En conséquence, il y a activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) qui va aboutir notamment à des perturbations et arrêt du cycle cellulaire (Taieb et al. 2016). En cas de dommages trop massifs, de l'apoptose peut être observée.

A notre connaissance, il manque des études expérimentales adressant le rôle de CDT dans la physiopathologie d'infections à *E. coli* et *a fortiori* d'infections urinaires. Cependant, sur la base des études épidémiologiques, il semblerait que le rôle ne soit pas majeur car la prévalence chez les UPEC est anecdotique (proche de 5%), y compris chez les isolats d'infections graves comme les urosepsis (Dubois et al. 2010).

Par ailleurs, il existe une autre génotoxine, la colibactine, qui est codée par l'îlot *pks* fortement associé au phylogroupe B2 et présent chez une large part des UPEC (Dubois et al. 2010; Krieger et al. 2011; Salvador et al. 2012) mais dont les conséquences et le rôle dans les infections urinaires n'ont jusque-là pas été étudiés. Il va s'agir d'un des objectifs de notre travail.

- 4) Les *E. coli* des bactériuries asymptomatiques : moins de virulence, une évolution vers le commensalisme ?

Des souches de *E. coli* peuvent aussi coloniser les voies urinaires sans pour autant entraîner une symptomatologie clinique : il s'agit des souches de bactériuries asymptomatiques (ABU pour *asymptomatic bacteriuria*). Elles vivent dans le tractus urinaire dans un mode de vie proche du commensalisme. Dans certains cas, leur élimination par traitement antibiotique augmente le risque de survenue et de récurrences d'infections urinaires symptomatiques (Cai et al. 2012). Elles auraient donc un rôle protecteur vis-à-vis des infections si bien que certaines souches sont considérées comme de véritables probiotiques.

Une souche en particulier a été très bien documentée, il s'agit de *E. coli* ABU83972, un véritable prototype d'ABU, devenu souche de référence. Cet *E. coli* a été isolé chez une fillette suédoise colonisée pendant trois années, sans ressentir de symptômes urinaires (Lindberg et al. 1975). *E. coli* ABU83972 possède des caractéristiques bien adaptées au système urinaire. En particulier, sa croissance dans l'urine est rapide, et, lorsqu'elle est mise en compétition *in vitro* avec des souches d'UPEC comme les *E. coli* CFT073 ou Nu14, elle surpasse largement l'uropathogène (Roos et al. 2006). Des systèmes efficaces de captation du fer (sidérophores et autres) pourraient être en jeu puisque lors de la colonisation de l'arbre urinaire humain par *E. coli* ABU83972 ils sont largement exprimés (Hancock et al. 2008).

Le génome de *E. coli* ABU83972, comme de nombreuses souches cliniques de bactériuries asymptomatiques, comporte des gènes qui codent pour des facteurs de virulence impliqués dans les infections urinaires (par exemple : *hly*, *cnf1*, *fimH*...) (Zdziarski et al. 2008; Tabasi et al. 2016). Cependant, dans un certain nombre de cas, les ABU se distinguent et semblent avoir évolué à partir des UPEC *stricto sensu* par moins de virulence, soit en raison de l'absence de gène codant pour les facteurs de virulence des UPEC, soit en raison d'une faible expression de ces gènes ou de mutations ponctuelles (Roos and Klemm 2006). Par exemple, nombreuses sont les souches d'ABU non hémolytiques, à l'adhérence modifiée (mutations de *papG* par exemple) ou encore avec un O-

antigène du lipopolysaccharide (LPS) tronqué, sans doute par évolution à partir d'une souche uropathogène (Klemm et al. 2006; Zdziarski et al. 2008; Salvador et al. 2012). Ces évolutions sont retrouvées à plus court terme en comparant l'isolat ABU83972 avant et après colonisation des voies urinaires humaines qui met également en évidence des mutations au niveau de gènes impliqués dans la virulence mais aussi le métabolisme ainsi que des modifications du transcriptome qui ne sont pas retrouvées lors de longues cultures *in vitro* (Zdziarski et al. 2010; Dobrindt et al. 2016). Ces modifications restent cependant généralement individuelles, preuve de l'importance de l'adaptation hôte-pathogène dans ce contexte. Ce type de « patho-adaptation » ou d'atténuation de virulence a vraisemblablement permis aux ABU de persister dans la sphère urinaire tout en ne déclenchant que peu ou pas de réponse de l'hôte.

Les propriétés probiotiques de *E. coli* ABU83972 ou de *E. coli* HU2117 (mutant de délétion  $\Delta papG$  de *E. coli* ABU83972) ont été reproduites chez l'Homme lors d'essais cliniques, afin de prévenir la survenue d'infections urinaires symptomatiques. L'inoculation intravésicale de ces souches chez des patients avec des troubles de la fonction vésicale comme des vidanges incomplètes de la vessie permet une colonisation à long terme de l'arbre urinaire. La fréquence des infections urinaires symptomatiques est diminuée dans la plupart des études, bien que réalisées sur un petit nombre de sujets, sans apparition d'effets secondaires majeurs (Hull et al. 2000; Darouiche et al. 2001, 2005; Sundén et al. 2006, 2010).

## D) Physiopathologie des infections urinaires

### 1) La colonisation digestive : une étape clé préalable à l'infection urinaire

L'histoire naturelle de l'infection urinaire commence classiquement par une contamination périurétrale par un *E. coli* en provenance de l'intestin qui en est le réservoir, bien que la physiopathologie précise ne soit pas à ce jour bien connue. Une des étapes clés de la physiopathologie des infections urinaires serait donc avant tout la colonisation digestive préalable. La capacité des souches de *E. coli* uropathogènes à trouver leur place au sein du microbiote intestinal et à coloniser la sphère digestive pourrait leur permettre également de mieux s'adapter au niveau de l'arbre urinaire (Schreiber et al. 2017b). Les facteurs permettant une meilleure nutrition et croissance bactérienne au sein du tube digestif puis de l'urine, comme ceux impliqués dans l'adhésion voire dans la compétition inter-bactéries par la sécrétion de toxines pourraient jouer un rôle. Dans tous les cas, il ne semble pas qu'une meilleure colonisation d'un des environnements s'accompagne d'une perte de

fitness dans l'autre, à l'opposé du modèle *sink-source* initialement proposé (Sokurenko et al. 2006; Chen et al. 2013; Schreiber et al. 2017b).

C'est très généralement un clone unique qui est responsable de l'infection (Willner et al. 2014). Le clone isolé dans une infection urinaire aiguë est quasi-systématiquement retrouvé au niveau des selles de manière concomitante et c'est généralement la souche prédominante de *E. coli* retrouvée au niveau de l'intestin à cet instant (Moreno et al. 2008). La population fécale des *E. coli* durant une infection urinaire est ainsi volontiers pauci-clonale, avec une sur-représentation du clone responsable de l'infection qui est généralement membre du groupe B2 et un de ceux possédant le plus de facteurs de virulence (Moreno et al. 2008). Ce réservoir intestinal est particulièrement important dans les infections urinaires récurrentes. En effet, dans certains cas il s'avère que la souche uropathogène à l'origine des infections à répétition reste présente au niveau digestif. Dans d'autres cas de récurrences cependant, il semblerait qu'un nouveau clone de *E. coli*, retrouvé au niveau urinaire et digestif, ait réussi à s'implanter de manière efficace (Chen et al. 2013). Dans cette perspective, l'utilisation de moyens thérapeutiques permettant de réduire voire d'éradiquer ce réservoir digestif pour prévenir les infections urinaires notamment récurrentes est séduisante (Spaulding et al. 2017). Notons que d'autres réservoirs peuvent ou pourraient exister : la vessie elle-même qui peut abriter des formes quiescentes d'UPEC comme nous le verrons par la suite ou encore le vagin dont il a été montré récemment que les cellules pourraient héberger des UPEC (Brannon et al. 2020).

## 2) Déroulement de l'infection urinaire

Suite à la contamination périurétrale par les uropathogènes, il y a colonisation de l'urètre, grâce notamment à des facteurs d'adhérence, avant atteinte par les bactéries de la vessie (Figure 7). L'infection est donc généralement par voie ascendante des voies urinaires et les infections rénales par voie hématogène sont rares (excepté le cas particulier des septicémies à *Staphylococcus aureus*).

L'infection symptomatique de la vessie constitue la cystite. Les bactéries se multiplient en son sein grâce à certains facteurs de virulence leur permettant la survie dans ce milieu. Cette survie nécessite la mise en place de mécanismes de résistance aux défenses de l'hôte et de captation de nutriments nécessaires à la croissance bactérienne en parallèle (Flores-Mireles et al. 2015).

Il peut y avoir ensuite ascension des bactéries jusqu'aux reins. L'infection de ces derniers notamment par des bactéries productrices de toxines va engendrer des dommages tissulaires importants. Cela constitue les pyélonéphrites. Du fait de la vascularisation importante de ces organes, en cas de lésion

tissulaire, il est possible d'observer des bactériémies et/ou sepsis secondaires à des pyélonéphrites (Subashchandrabose and Mobley 2015b).

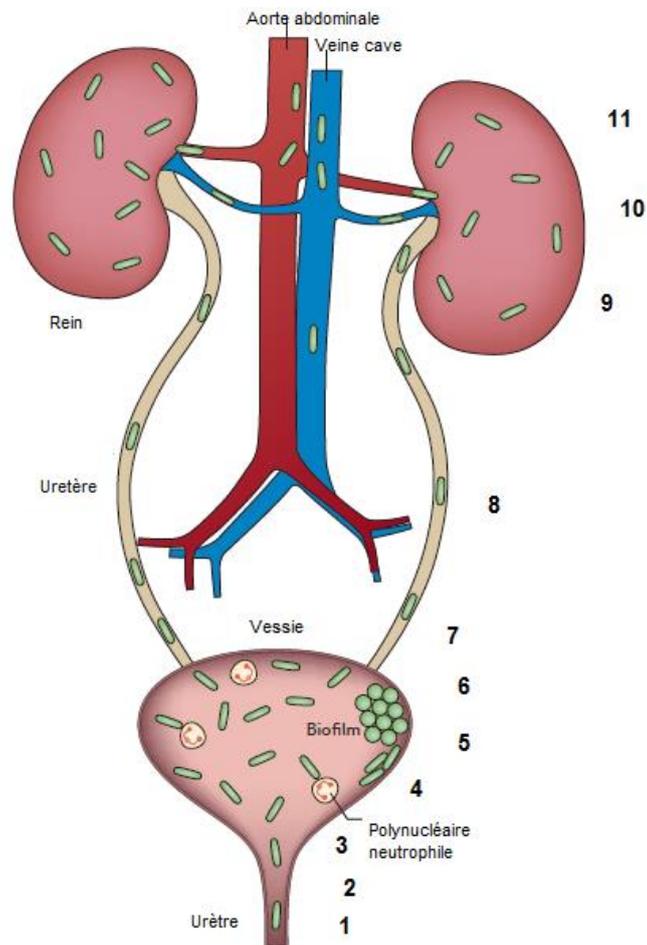


Figure 7 : Physiopathologie des infections urinaires, adaptée d'après (Flores-Mireles et al. 2015). 1) Contamination de la zone périurétrale par un uropathogène en provenance de l'intestin. 2) Colonisation de l'urètre et migration vers la vessie. 3) Colonisation et invasion de la vessie, médiée par facteurs d'adhésion. 4) Infiltration par les polynucléaires neutrophiles. 5) Multiplication bactérienne et résistance aux défenses de l'hôte. 6) Formation de biofilm. 7) Dommages aux cellules épithéliales par production de toxines et protéases. 8) Ascension jusqu'aux reins. 9) Colonisation des reins. 10) Dommages aux tissus par les toxines bactériennes. 11) Bactériémie possible.

### 3) Les UPEC, des bactéries intracellulaires facultatives

#### a. L'urothélium

L'épithélium qui recouvre la surface interne de la vessie est l'urothélium. Il s'agit d'un épithélium de transition ou transitionnel dont l'aspect change en fonction de la distension et du remplissage de la vessie (Dalghi et al. 2020).

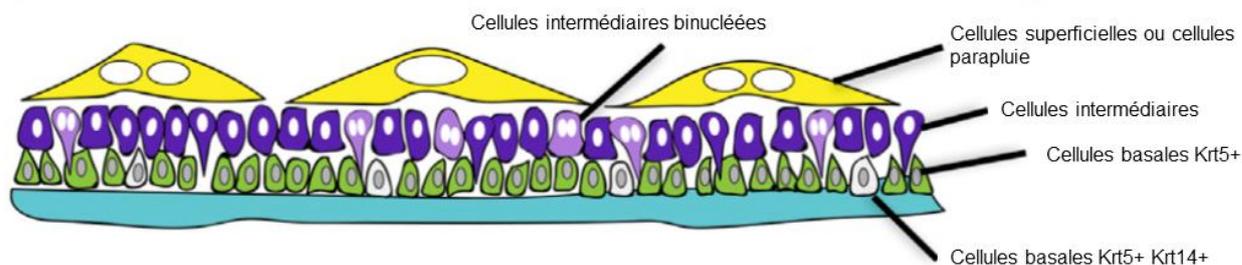


Figure 8 : Organisation de l'urothélium. L'urothélium est un épithélium composé de différentes couches cellulaires représentées schématiquement dans la partie supérieure. D'après (Wang et al. 2018).

Il est composé de différents types cellulaires :

#### Les cellules superficielles ou cellules parapluie (« umbrella cells »)

Il s'agit des cellules les plus superficielles (Figure 8). Elles peuvent mesurer jusqu'à 250µm de large. Elles sont binucléées et polyploïdes (contenu en ADN de  $4n+4n$ ). Le caractère polyploïde de ces cellules superficielles pourraient être un avantage en termes d'adaptation rapide aux changements d'environnement et favorable pour un métabolisme intense, tout en maintenant la barrière urothéliale intacte (au contraire de divisions cellulaires) (Wang et al. 2018). En temps normal, l'urothélium est d'ailleurs quiescent et il y a peu de multiplication cellulaire. La durée de vie d'une cellule superficielle atteindrait presque un an sans l'apparition de dommages. Elles forment une couche monocellulaire de cellules adhérentes par des jonctions cellulaires résistant à la pression et remplissent ainsi leur rôle de barrière entre l'urine et le milieu interstitiel/sanguin. Elles sont ainsi les premières exposées à l'urine, aux ions, mais aussi aux toxiques et bactéries... qui peuvent se retrouver dans la lumière vésicale. Au sein de leur membrane elles présentent des structures particulières, les unités asymétriques de membrane (AUM) qui sont très riches en glycoprotéines transmembranaires spécifiques, les uroplakines (Upk). Les cellules superficielles permettent à la surface de la vessie de se modifier pour s'adapter aux successions de vidanges/remplissages à laquelle elle est soumise constamment. Ce phénomène est lié à la variation de la surface de leur membrane apicale grâce à un transport intense de vésicules discoïdes ou fusiformes qui contiennent membrane et AUM. Elles vont être exportées au niveau membranaire pour augmenter la surface cellulaire puis être endocytées pour la diminuer (Dalghi et al. 2020). Les cellules superficielles sont recouvertes d'une couche de mucus composée de glycosaminoglycanes et de protéoglycanes qui constitue une barrière physique vis-à-vis des pathogènes (Lacerda Mariano and Ingersoll 2020).

#### Les cellules intermédiaires

Ce sont les cellules situées sous la couche de cellules superficielles (Figure 8). Le nombre de couches de ces cellules peut apparaître variable en fonction du remplissage et de la distension vésicale mais aussi des espèces (Wang et al. 2017). Elles peuvent jouer le rôle de progéniteurs des cellules superficielles. En particulier, il existe une sous-population de cellules intermédiaires binucléées, dérivant des cellules intermédiaires mononucléées par un processus d'endomitose (Figure 8) (Wang et al. 2018). Lors d'une atteinte aux cellules superficielles, par exemple lors d'une infection urinaire reproduite en modèle murin, ces cellules binucléées peuvent donner des cellules superficielles après notamment une étape d'endoréplication augmentant leur contenu en ADN (Wang et al. 2018). Les processus et les cellules à l'origine de la régénération semblent cependant varier en fonction de la nature et de l'intensité des dommages à l'urothélium.

#### Les cellules basales

Ce sont les plus petites cellules de l'urothélium, attachées à la membrane basale (Figure 8). En cas de dommage à l'urothélium, elles peuvent se multiplier et donner naissance à des cellules intermédiaires. En cas de dommages répétés, ce pourraient même devenir le principal pool de progéniteur pour régénérer l'ensemble des lignées de l'urothélium (Wang et al. 2018). Au sein des cellules basales kératine 5+ (Krt5+), une sous-population de cellules Krt14+ a été identifiée comme potentielles cellules souches urothéliales chez la souris. Elles sont présentes à la fois chez l'embryon et chez l'adulte. Leur prolifération peut participer à la régénération de l'ensemble des lignées cellulaires de l'urothélium après des dommages chimiquement induits par le cyclophosphamide (Papafotiou et al. 2016). Dans des modèles de cancers vésicaux chimiquement induits où les lignées cellulaires sont suivies, un grand nombre de lésions proviennent de cellules basales Krt14+ (Papafotiou et al. 2016). Chez l'Homme, des cellules Krt14+ sont retrouvées dans des tissus de cancers de vessie, mais cette population de cellules basales n'a jamais été identifiée en condition physiologique (Paraskevopoulou et al. 2016).

#### *b. Cycle intracellulaire*

Les premières observations montrant des UPEC intracellulaires remontent aux années 1970 par l'utilisation de la microscopie électronique (Fukushi et al. 1979). L'idée même que cette invasion puisse être protectrice pour les bactéries et leur permettre d'accéder à des nutriments et de résister aux défenses immunitaires comme aux traitements antibiotiques, a émergé à la fin des années 1990 et fut le point de départ de nombreuses études sur le cycle de vie intracellulaire des UPEC (Mulvey et al. 1998; Lewis et al. 2016). Très vite, deux types de réservoirs intracellulaires ont été distingués : un premier dans les cellules superficielles, qui sera nommé ensuite communautés bactériennes

intracellulaires (IBC, *intracellular bacterial community*) et qui est rapidement éliminé lors de l'infection aiguë ; et un second dans les cellules intermédiaires voire basales constitué de quelques bactéries qui pourraient persister plus longuement au terme de l'infection sous forme quiescente et constituer un réservoir à l'origine de récurrences, appelé réservoir intracellulaire quiescent (QIR, *quiescent intracellular reservoir*) (Mulvey et al. 2001).

La dynamique intracellulaire de l'infection urinaire par les UPEC a été caractérisée par vidéo-microscopie à partir d'explants de vessies murines infectées par des UPEC (Justice et al. 2004) (Figure 9 & Figure 10).

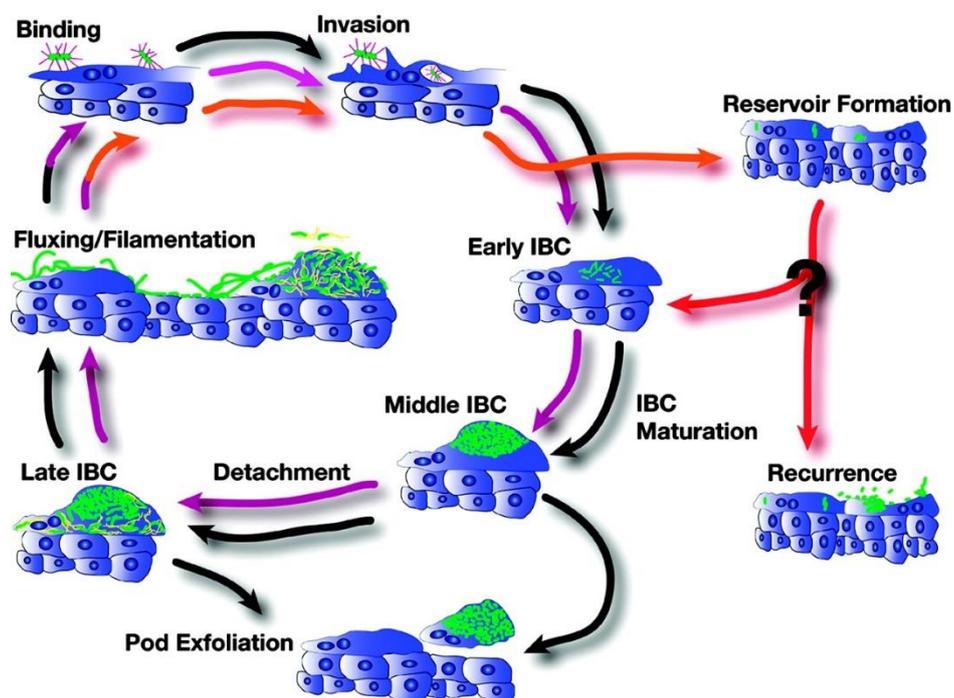


Figure 9 : Modèle du cycle intracellulaire des UPEC. Le premier cycle (flèches noires) peut aboutir à la progression vers un second cycle (flèches violettes)... Lors du premier cycle, les IBC précoces (early IBC) sont observés dès 1 à 3 h après l'infection dans les cellules superficielles urothéliales et se caractérisent par la présence de bacilles se multipliant très rapidement. Les IBC intermédiaires (middle IBC) sont présentes dès 6 à 8 h après l'infection et correspondent à une maturation des bactéries devenant coccoïdes, s'entourant de matrice extracellulaire et avec une multiplication ralentie (>1 h) mais toujours présente. A partir de 12 h après l'infection, dans les IBC tardifs (late IBC), les bactéries redeviennent bacillaires et mobiles voire filamentent et s'échappent de la cellule urothéliale. Il peut y avoir formation d'un réservoir quiescent (flèches rouges, QIR), ici représenté au sein des cellules superficielles mais potentiellement également au sein de couches plus profondes de l'urothélium qui peuvent donner lieu à des récurrences. D'après (Justice et al. 2004).

Après l'attachement aux cellules urothéliales superficielles, il y a invasion de ces cellules. Le mécanisme clé permettant l'invasion est la fixation de l'adhésine FimH des pili de type 1 sur les uroplakines et les intégrines  $\beta 1$  et  $\alpha 3$  de la surface cellulaire (Martinez et al. 2000; Eto et al. 2007). Leur fixation va déclencher une cascade de signalisation intracellulaire menant à des réarrangements du cytosquelette d'actine ce qui va permettre l'internalisation des bactéries via un mécanisme fermeture éclair (*zippering mechanism*) (Martinez et al. 2000). Il peut également y avoir endocytose

passive des bactéries lors de la rétractation de la membrane contenant les uroplakines suite à la vidange vésicale, ce qui permet aux UPEC de se protéger vis-à-vis de l'élimination par la miction (Bishop et al. 2007).

Après l'internalisation, les UPEC se retrouvent dans des vésicules d'endocytose RAB27b+ qui possèdent le même marqueur que les vésicules fusiformes contenant les uroplakines (Figure 11) (Bishop et al. 2007). Ces vésicules peuvent être exocytées et ainsi les UPEC expulsés en réponse à l'augmentation de la concentration en AMPc qui survient lors de la détection du pathogène intracellulaire par TLR4 (Toll-like receptor) (Figure 11). Cependant, dans certains cas les UPEC peuvent rompre cette vésicule RAB27b+ et se retrouver soit dans le cytoplasme (ce qui peut conduire à la formation d'IBC), soit être ciblés par l'autophagie et se retrouver dans des autophagosomes. Ce phénomène pourrait être facilité par la faible densité d'actine au sein des cellules superficielles (Eto et al. 2006).

Les autophagosomes vont évoluer en lysosomes dont le fonctionnement est perturbé par les UPEC qui neutralisent leur pH (Miao et al. 2015). Ces lysosomes dysfonctionnels sont finalement détectés par la cellule eucaryote et expulsés avec les bactéries qu'ils contiennent (Figure 11). Dans les endosomes tardifs, les UPEC détournent également la protéine RAB35 normalement impliquée dans le recyclage de la transferrine et qui leur permet ainsi d'assurer leurs besoins en fer (Dikshit et al. 2015).

Une fois dans le cytoplasme, c'est un clone bactérien unique va proliférer sous la forme au sein des différentes cellules superficielles (Schwartz et al. 2011). En modèle murin, la multiplication survient dès les premières heures et est très rapide, avec une vitesse proche de celle observée en culture de laboratoire dans les premières phases (proche d'un temps de doublement de 30 min) pour aboutir à la formation d'IBC (Justice et al. 2004). Les IBC sont composés de nombreuses bactéries de forme bacillaires puis coccoïdes dont l'organisation prend peu à peu les traits caractéristiques d'un biofilm avec la présence d'une matrice polysaccharidique enchâssant différentes sous-populations de bactéries (Anderson et al. 2003). La multiplication bactérienne peut continuer jusqu'à occuper tout l'espace de la cellule superficielle, formant de sortes de « gousses » (*pods*) intracellulaires remplies de dizaines de milliers d'UPEC. En lien avec la réponse immunitaire, les IBC peuvent être exfoliées et relarguées dans l'urine, propageant ainsi les UPEC dans le milieu extérieur. Cependant en contrepartie les couches plus profondes de l'urothélium sont alors exposées.

Des bactéries peuvent également s'échapper des IBC matures notamment sous formes filamenteuses mobiles allant jusqu'à 100µm et particulièrement résistantes aux polynucléaires neutrophiles en comparaison des bacilles (Horvath et al. 2011). La filamentation peut être induite par la réponse

immunitaire médiée par TLR4 elle-même, qui déclenche chez les UPEC une réponse SOS ayant pour conséquence le blocage de la division cellulaire médiée par SulA (Justice et al. 2006; Li et al. 2010). D'après une autre équipe, une voie additionnelle médiée par la protéine de division cellulaire DamX pourrait également déclencher la filamentation en réponse au changement des conditions physico-chimiques et mécaniques lors du passage du milieu intracellulaire à l'urine (Khandige et al. 2016). Ces UPEC extracellulaires vont pouvoir réinfecter de nouvelles cellules urothéliales et recommencer un nouveau cycle de formation d'IBC (Figure 9 & Figure 10).

Les IBCs et cette dynamique sont facilement reproduit *in vivo* dans un modèle murin d'infection urinaire (Figure 10). De plus, des cellules superficielles exfoliées contenant des IBC sont également retrouvées dans des urines humaines de patients souffrant d'infections urinaires, adultes et enfants, montrant que ce cycle intracellulaire décrit dans un modèle murin existe également chez l'Homme, même si la cinétique peut être différente (Rosen et al. 2007; Robino et al. 2013).

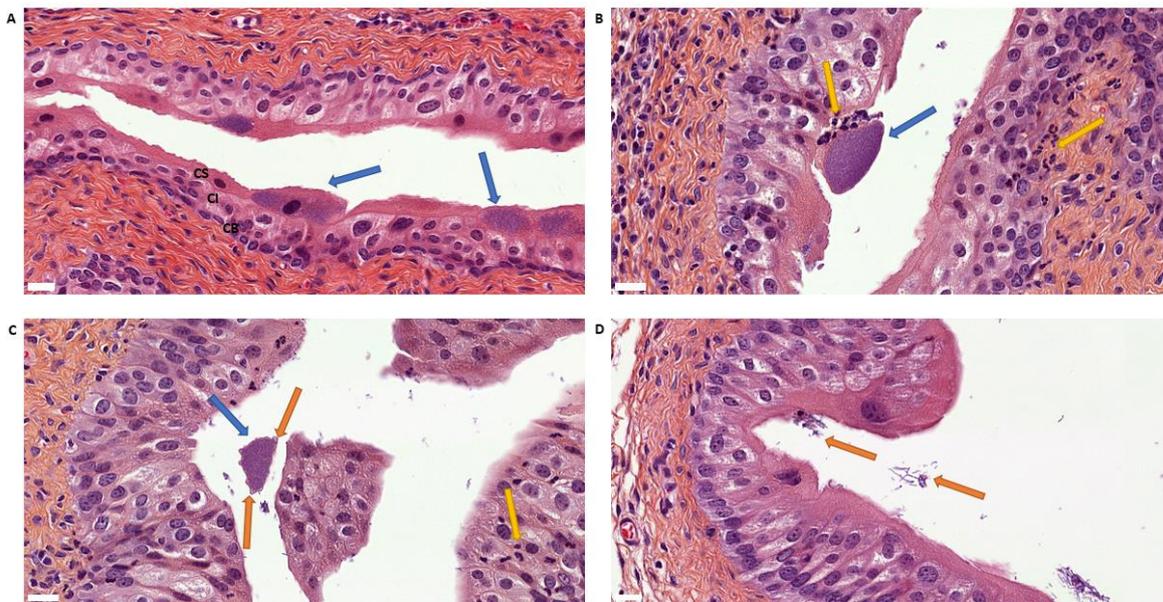


Figure 10 : Le cycle intracellulaire des UPEC est facilement reproduit en modèle murin d'infection urinaire, ici 6h (A) et 24h (B-D) après infection de souris femelles C3H/HeN par *E. coli* UT189. Les coupes de vessies obtenues ont été marquées par coloration hématoxyline-éosine. A. Dès 6h après infection on observe la formation d'IBC (flèche bleue) au sein des cellules superficielles (CS) qui surplombent les cellules intermédiaires (CI) et cellules basales (CB) de l'urothélium. B. 24h après infection l'infiltration des polynucléaires neutrophiles est notable (flèche jaune), notamment à proximité des cellules superficielles contenant les IBC dont la formation constitue une protection. C. Ces cellules superficielles vont le plus souvent être exfoliées et ce phénomène coïncide avec l'apparition de bactéries filamenteuses mobiles qui peuvent ressortir de ces cellules (flèche orange). D. Ces bactéries filamenteuses peuvent se retrouver au niveau de la lumière vésicale et aller infecter de nouvelles cellules urothéliales. Acquisition grâce au scanner PanoramicViewer et visualisation grâce au logiciel CaseViewer. Barre d'échelle = 20µm.

Dans d'autres cas, l'invasion (notamment de cellules non superficielles qui ont un réseau d'actine dense) peut aboutir à la formation d'un réservoir composé d'un faible nombre de bactéries

quiescentes (QIR), persistant au moins plusieurs jours dans les modèles utilisés. Elles subsisteraient également suite à un traitement antibiotique efficace pour stériliser l'urine (Lewis et al. 2016). Les bactéries sont enchâssées par de l'actine qui bloque leur réplication et leur échappement vers le cytosol tout en les protégeant au sein de vésicules proches d'endosomes tardifs (Eto et al. 2006). Cependant, la distension de ce réseau d'actine, que ce soit lors de la différenciation cellulaire (par exemple en réponse à une exfoliation) ou par action pharmacologique, entraîne la reprise de la multiplication cellulaire cytoplasmique (Eto et al. 2006). Ainsi la résurgence des UPEC de ces réservoirs quiescents pourrait être une source de rechute ou de récurrence d'infection urinaire (Mysorekar and Hultgren 2006). Suivant ce raisonnement, l'administration d'un traitement antibiotique en parallèle d'un agent exfoliant comme le chitosan permettrait d'éradiquer ou du moins de diminuer ces réservoirs (Blango et al. 2014).

#### 4) Réponses de l'hôte à l'infection urinaire

##### *a. Réponse immunitaire (innée)*

Comme nous l'avons vu, l'urothélium constitue une barrière importante vis-à-vis de l'urine et de ses composés. Lors d'une infection urinaire, la réponse immunitaire innée est finement orchestrée pour maintenir au maximum ou le cas échéant réparer au plus vite cette barrière. Dans cette partie nous parcourons rapidement les principaux acteurs cellulaires en jeu (Figure 11).

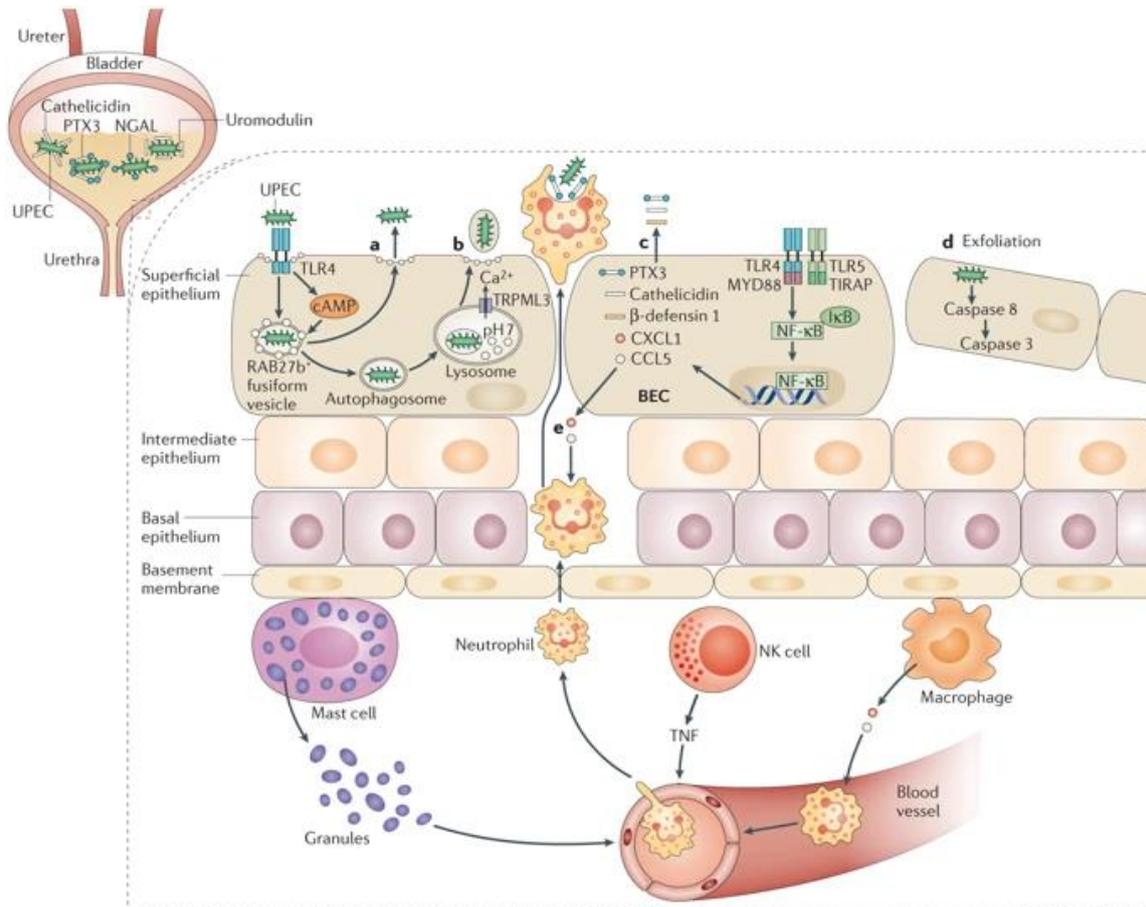


Figure 11 : Aperçu de la réponse immunitaire innée lors de l'infection urinaire dans la vessie. a. Suite à l'invasion des cellules épithéliales de la vessie (BEC), les UPEC sont encapsulés dans des vésicules RAB27b+. Le TLR4 reconnaît alors ces pathogènes intracellulaires et augmente la concentration d'AMPc. Cela entraîne l'exocytose des vésicules RAB27b+ contenant les UPEC et ainsi leur expulsion dans la lumière vésicale. b. Si les UPEC échappent à l'expulsion par le mécanisme précédent en rompant la vacuole RAB27b+, les bactéries sont ciblées par l'autophagie et délivrées aux lysosomes. Ces derniers sont perturbés par les UPEC pour perdre leur capacités dégradatives. Cependant ces lysosomes dysfonctionnels sont détectés par le canal lysosomal TRPML3 (transient receptor potential mucolipin 3) ce qui déclenche leur exocytose et donc l'expulsion des UPEC. c. Suite à la détection des pathogènes par TLR4 et à la cascade de signalisation en découlant, un cocktail de molécules solubles est sécrété par les cellules épithéliales comme des peptides et protéines antimicrobiens (cathelicidine, défensine-1, pentraxine 3 (PTX3)) ou des chimiokines (CXCL1, CCL5). d. Les infections bactériennes peuvent également déclencher l'apoptose via la voie des caspases 3 et 8, entraînant l'exfoliation des cellules épithéliales ce qui permet de diminuer la charge bactérienne. e. La réponse immunitaire innée est finement coordonnée : les cellules immunitaires résidentes (mastocytes, macrophages, cellules NK) agissent comme des sentinelles qui peuvent détecter la présence de l'infection et sécréter des cytokines variées pour recruter d'autres cellules immunitaires circulantes comme les polynucléaires neutrophiles pour combattre l'infection. D'après (Abraham and Miao 2015).

### Les cellules épithéliales

La première ligne de défense contre l'infection est constituée par les cellules urothéliales elles-mêmes, en particulier les cellules superficielles de la vessie. Leurs capacités de détection et d'expulsion des UPEC intracellulaires est ainsi un premier moyen de défense, comme vu précédemment.

La détection des pathogènes se fait grâce à des récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRR, *pattern recognition receptor*) tels que les récepteurs Toll-like (TLR4 et TLR5)

détectant différents motifs bactériens. Par exemple TLR4 peut reconnaître les pathogènes via une interaction avec le LPS ou les fimbriae (pili de type 1 notamment) alors que TLR5 reconnaît la flagelline des flagelles de *E. coli* (Nielubowicz and Mobley 2010). Cette stimulation active la voie NFκB et l'expression de gènes proinflammatoires comme ceux codant pour les cytokines Il-6 et Il-8, cette dernière favorisant le recrutement des neutrophiles (Ching et al. 2020). En réponse à l'Il-6, les cellules épithéliales produisent également des peptides antimicrobiens comme la défensine-1 ou la cathélicidine qui ont une activité antibactérienne (Figure 11) (Chromek et al. 2006)

De plus les UPEC (notamment producteurs de toxines comme l'hémolysine A) peuvent déclencher la voie de l'inflammasome dépendant de NLRP3, ce qui conduit à l'activation de la caspase 1. La caspase 1 peut d'une part cliver la pro-Il-1β en Il-1β, un médiateur pro-inflammatoire important pour l'élimination bactérienne et d'autre part induire la mort cellulaire par pyroptose, ce qui va conduire à l'exfoliation (Hamilton et al. 2017).

L'exfoliation des cellules massivement infectées est un moyen de défense : elle permet de se débarrasser à la fois des bactéries et de cellules urothéliales potentiellement remplies de médiateurs pro-inflammatoires, eux-mêmes pouvant être toxiques. Ces cellules sont rapidement remplacées car une phase de prolifération intense de l'urothélium se met alors en place (Wang et al. 2018). Toutefois le processus d'exfoliation a aussi comme conséquence d'exposer temporairement les couches les plus profondes de l'urothélium aux bactéries et pourrait ainsi potentiellement favoriser la formation de QIR.

### Les neutrophiles

Ce sont les premières cellules immunitaires recrutées sur le site de l'infection lors de l'infection urinaire (Figure 10 B), notamment en réponse à la production de chimiokine CXCL1. Elle est produite par exemple par les cellules épithéliales ou les cellules immunitaires résidentes (mastocytes et macrophages) après activation de leurs récepteurs PRR (Figure 11) (Abraham and Miao 2015).

Ils permettent de contrôler l'infection par différents moyens : production de composés toxiques et d'espèces réactives de l'oxygène, production de lipocaline-2 prévenant l'absorption du fer par les bactéries (séquestration du sidérophore entérobactine), phagocytose... Cependant leur activité est à double tranchant et doit être finement régulée car ils peuvent également induire des dommages importants au tissu hôte. Ainsi une réponse inflammatoire aiguë sévère précoce favorise la chronicité et la survenue de cystites récurrentes en modèle murin (Hannan et al. 2010). C'est plus précisément la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) des neutrophiles (à l'origine de lipides pro-inflammatoires) qui jouerait un rôle clé puisque son inhibition atténue ce phénomène (Hannan et al. 2014; O'Brien et al. 2017).

Chez ces individus, l'infection semble difficile à résoudre et l'épithélium exfolié n'est pas entièrement régénéré, ce qui pourrait favoriser l'accès des UPEC aux couches plus profondes.

#### Les macrophages

Il existe des macrophages résidents au niveau de la vessie, qui agissent comme de véritables sentinelles via leurs fonction de cellules présentatrices de l'antigène (Lacerda Mariano and Ingersoll 2018). Lors de l'infection, ils vont notamment produire des chimiokines comme CXCL1 pour le recrutement des neutrophiles mais également des chimiokines CCL2 permettant le recrutement de macrophages additionnels. Le dialogue chimique entre ces deux types de macrophages va favoriser la migration des polynucléaires neutrophiles. De plus, lorsque les macrophages phagocytent des UPEC, la voie de l'inflammasome NLRP3 peut être déclenchée conduisant à la production d'IL-1 $\beta$  (Hamilton et al. 2017). Notons que la production par certaines souches d'UPEC de la protéine TspC (Toll/IL-1 receptor-containing (TIR-containing) protein C) permet de perturber cette voie de signalisation chez les macrophages (Waldhuber et al. 2016).

#### Les mastocytes

Les mastocytes sont d'autres cellules résidentes de la vessie jouant le rôle de sentinelle. Ces cellules ont la particularité de renfermer des granules stockant des médiateurs pro-inflammatoires (cytokines, enzymes, histamine...) qui vont être relarguées après activation (Figure 11). Durant l'infection urinaire, c'est la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les cellules épithéliales infectées qui active et induit la migration des mastocytes à proximité. Leur dégranulation locale libère de la chymase, internalisée par les cellules épithéliales et qui va induire la caspase 1 à l'origine de la mort cellulaire et de l'exfoliation (Choi et al. 2016). Les mastocytes semblent avoir également rapidement un rôle anti-inflammatoire et réparateur grâce à la production dans un second temps d'IL-10, ce qui pourrait favoriser la persistance bactérienne (Chan et al. 2013).

#### *b. Douleur*

Les mécanismes physiopathologiques induisant et diminuant la douleur suite à une infection urinaire sont actuellement mal connus. Les modèles d'étude animaux ne permettent qu'une approche partielle de cette sensation subjective, notamment par l'observation d'une allodynie qui est une hypersensibilité à un stimulus normalement non douloureux.

Durant les infections urinaires, la barrière vésicale perd sa fonction, en raison d'une apoptose ou exfoliation des cellules urothéliales par exemple médiée par FimH lors de l'invasion par les bactéries, ou bien liée à la sécrétion de toxines bactériennes comme l'hémolysine. L'infection bactérienne est également à l'origine d'une inflammation. Des composés (par exemple : ATP, eicosanoïdes,

cytokines, neuropeptides...), en provenance des cellules lysées et des leucocytes amenés par l'infection, peuvent activer les nocicepteurs présents dans le muscle lisse qui tapisse la paroi vésicale, mais également au niveau de la *lamina propria* voire en contact étroit avec l'urothélium (Birder and Klumpp 2016). Ils peuvent induire une douleur par déclenchement directement de potentiels d'action neuronaux ou indirectement par diminution du seuil d'activation neuronal, les rendant plus sensibles (Figure 12). Il existe des récepteurs canaux ioniques (ou TRP pour *transient receptor potential*) sensibles à différentes substances ainsi qu'aux variations de température qui vont entraîner la dépolarisation de la terminaison libre puis activer les canaux sodiques à l'origine de la transduction du signal. Au niveau de la vessie, dans le cas d'une inflammation liée à une infection, les médiateurs inflammatoires pourraient ainsi diminuer les seuils de douleur liée au remplissage vésical (Birder and Klumpp 2016).

Durant l'infection urinaire, la douleur serait en partie médiée par le récepteur TLR4 (Bjorling et al. 2008) au LPS bactérien, présent sur les macrophages et entraînant leur activation, l'urothélium (Szasz et al. 2016), mais également coexprimé avec TRPV1 (*transient potential receptor vanilloide 1*) sur des neurones nociceptifs (Wadachi and Hargreaves 2006). C'est le TLR4 des cellules non-hématopoïétiques qui serait en cause (Rudick et al. 2012). La stimulation du récepteur TLR4 urothélial pourrait ainsi augmenter l'expression et la sensibilité de TRPV1 (Rosen and Klumpp 2014). TRPV1 est un récepteur TRP qui joue un rôle important dans l'augmentation de la sensibilité vésicale aux distensions dans un contexte inflammatoire (Wang et al. 2008). Par ailleurs, une étude a montré l'implication d'un autre récepteur, mGluR5 (récepteur métabotrope au glutamate 5), dans le développement d'une hyperalgésie lors de la distension de la vessie au cours d'une infection à *E. coli* (Crock et al. 2012). Ces différents mécanismes pourraient également être impliqués dans la persistance de la douleur à distance de l'infection bactérienne.

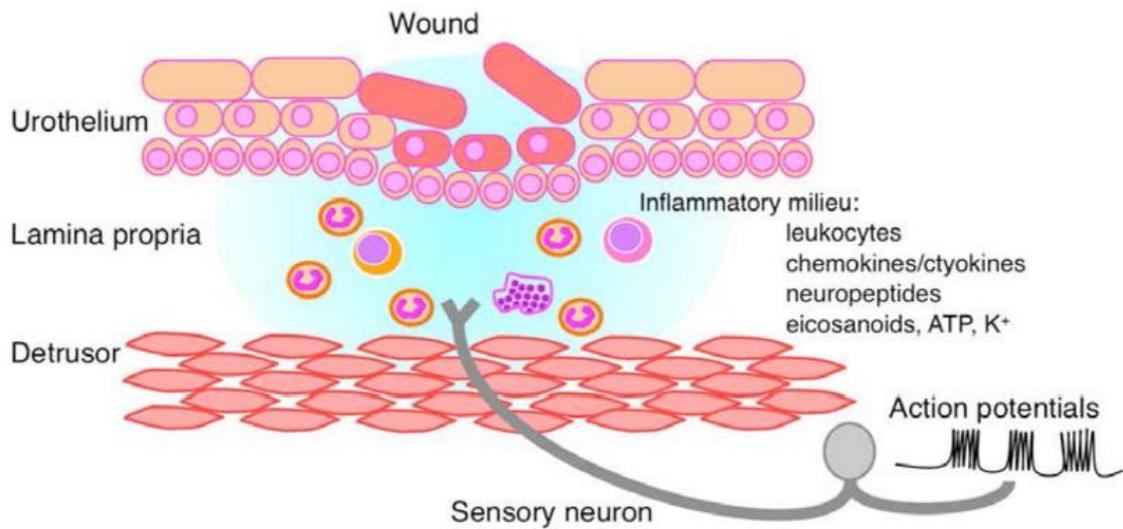


Figure 12 : Douleur inflammatoire dans l'infection urinaire. Les composés en provenance de cellules lysées ou de leucocytes peuvent déclencher une douleur ou diminuer le seuil de déclenchement d'un signal douloureux. D'après (Birder and Klumpp 2016).

Toutefois, les facteurs bactériens à l'origine de la douleur lors d'une infection urinaire sont mal connus. Ainsi, des études ont porté sur les mécanismes bactériens qui permettent d'expliquer l'apparition de douleur en modèle murin après une infection par un UPEC qui n'est pas observée lors d'une colonisation par *E. coli* ABU83972, souche de bactériurie asymptomatique. La douleur observée semble indépendante de l'inflammation qui est identique lors de l'administration des deux bactéries (Rudick et al. 2010). La variabilité de la réponse douloureuse pourrait être médiée par la variabilité du LPS bactérien, notamment de la partie glycosylée (O-antigène), tronquée chez *E. coli* ABU83972 contrairement à la plupart des UPEC (Rudick et al. 2012). Rudick *et al.* ont ainsi étudié la douleur induite par des extraits de LPS de *E. coli* ABU83972 dans un modèle murin. Ces extraits n'entraînent pas de douleur dans ce modèle (au contraire d'extraits de LPS de l'UPEC *E. coli* Nu14) et même diminuent la douleur induite par une infection urinaire avec l'UPEC *E. coli* Nu14 lorsqu'ils sont administrés 24h après (Rudick et al. 2010). L'hypothèse proposée par les auteurs est celle d'une compétition au niveau de TLR4.

## II) L'îlot *pks*

### A) Présentation

#### 1) Historique

Comme nous l'avons vu, l'importante diversité des phénotypes et des pathologies observés est liée à la diversité génétique des souches de *E. coli*. Elle repose en particulier sur l'acquisition ou la perte de facteurs d'adaptation ou de virulence. Les gènes qui codent pour ces facteurs d'adaptation ou de virulence peuvent être portés par des éléments génétiques mobiles, comme les îlots génomiques. Certains îlots génomiques portent des îlots de pathogénicité qui regroupent un cluster de gènes impliqués dans la virulence.

En 2006, un nouvel îlot de pathogénicité a été décrit, l'îlot *pks* (Nougayrède et al. 2006). Il a été découvert suite à la mise en évidence d'un phénotype de mégalytose chez des cellules eucaryotes en culture infectées par certaines souches de *E. coli* mais non expliqué par les toxines altérant le cycle cellulaire de l'hôte connues à cette époque. Les enzymes codées par les gènes de cet îlot correspondent à des enzymes impliquées dans une machinerie de biosynthèse de type polykétide-peptide non ribosomal synthase (PK-NRPS), d'où le nom îlot *pks*. Les effets observés lors de cette découverte ont été reliés à une génotoxine, nommée la colibactine, de nature PK-NRP. Par la suite, d'autres métabolites d'intérêt biologique produits grâce à l'îlot *pks* ont été découverts lors d'études chez différentes souches bactériennes et sur le fonctionnement de la machinerie de biosynthèse codée par cet îlot.

#### 2) Structure

L'îlot *pks* est un îlot de pathogénicité de 54kb qui comporte 19 gènes, notés *clbA* à *clbS*, qui codent pour différentes enzymes (Figure 13)(Nougayrède et al. 2006; Taieb et al. 2016). La plupart de ces enzymes sont impliquées dans une machinerie de biosynthèse de type mégasynthase.

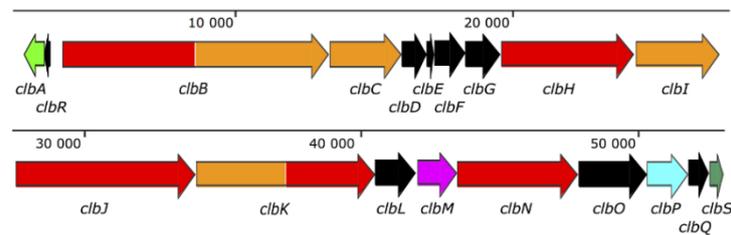


Figure 13 : L'îlot *pks*. L'îlot génomique *pks* comprend 19 gènes codant des *PK-synthases* (PKS), des *NRP-synthases* (NRPS), ou des hybrides *PKS-NRPS*, une *phosphopantéthéinyl transférase* (PPTase), des enzymes accessoires, une *pompe à efflux*, une *peptidase périplasmique*, et une *protéine de résistance*. D'après (Taieb et al. 2016).

### 3) Epidémiologie

Parmi les *E. coli*, l'îlot *pks* est retrouvé principalement chez des souches du groupe phylogénétique B2, auquel appartient la majorité des souches d'UPEC (Johnson et al. 2008b). Il est présent chez d'autres entérobactéries comme *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes* (ex-*Enterobacter aerogenes*), *Citrobacter koseri* ou *Erwinia oleae* (Putze et al. 2009). On retrouve également des analogues chez des espèces bactériennes du genre *Pseudovibrio* isolées d'éponges (Bondarev et al. 2013) et chez la symbionte du tube digestif de l'abeille *Frischella perrara* (Engel et al. 2015).

Durant l'évolution, l'îlot *pks* a été acquis par transfert horizontal chez *E. coli* mais son origine reste inconnue. Il y a vraisemblablement eu plusieurs événements d'acquisition de l'îlot *pks* qui ont conduit à l'insertion à des endroits différents du chromosome (Auvray et al. 2021; Wami et al. 2021). Cependant il demeure hautement conservé tant dans la séquence que dans la capacité de produire des métabolites dont la génotoxine colibactine.

### B) Fonctionnement de la machinerie *pks* : état de l'art

#### 1) Les PK-NRP et machineries PK-NRPS

##### a. Généralités

L'îlot *pks* code pour une machinerie de biosynthèse hybride de type PK-NRPS. Les polykétides synthases (PKS) et non-ribosomal peptides synthases (NRPS) sont deux types de machineries de biosynthèse multimodulaires fonctionnant selon une logique très proche qui s'apparente à celle

d'une chaîne de montage d'usine. Les métabolites sont produits par élongation d'une chaîne (oligomère) avec ajout séquentiel et dans un ordre défini de « briques » (monomères) par différentes enzymes PKS et/ou NRPS (Fischbach and Walsh 2006). Ce type de machineries aboutit à la synthèse de métabolites secondaires, qui sont donc des métabolites non indispensables à la nutrition et à la croissance (au contraire des métabolites primaires comme les acides aminés, les acides nucléiques, les sucres ou les lipides).

Les métabolites PK-NRP sont des produits naturels très répandus et ils sont d'une diversité exceptionnelle. Ils constituent un vivier de molécules originales et potentiellement bioactives avec de potentiels impact sur la santé humaine et nourrissent ainsi un engouement scientifique certain. Ainsi de nombreuses familles d'antibiotiques (macrolides, glycopeptides, bêta-lactamines...) l'immunosuppresseur rapamycine et l'anticancéreux bléomycine sont par exemple des PK, NRP ou hybrides PK-NRP largement utilisés en thérapeutique (Fischbach and Walsh 2006). La diversité des métabolites produits et l'originalité de la structure des PK-NRP proviennent à la fois de la diversité des monomères utilisés et de leur agencement et modifications.

Les machineries PK-NRPS sont essentiellement retrouvées chez les bactéries et champignons, mais certains organismes plus complexes comme les arthropodes ou les mollusques contiennent également des gènes codant pour ce type de machinerie (Wang et al. 2014a). Chez *E. coli*, il n'existe à ce jour que quatre NRP ou PK-NRP décrits : la colibactine (PK-NRPS), la yersiniabactine (PK-NRPS), l'entérobactine (NRP) et les salmochélines (NRP).

D'un point de vue métabolique, les gènes codant pour les machineries PK-NRPS sont souvent retrouvés comme pour l'îlot *pks* en clusters, ce qui permettrait une régulation coordonnée pour une expression synchronisée ou du moins optimale (Fischbach and Walsh 2006).

#### *b. Les monomères*

Les machineries PK-NRPS utilisent comme monomères :

- Pour les PKS : des acides organiques activés par le coenzyme A (CoA) : malonyl-CoA, méthylmalonyl-CoA et des variants (avec chaînes acyles),
- Pour les NRPS : des acides aminés (protéinogéniques ou non), des acides aryles mais également des substrats moins conventionnels pouvant être très variés. Ils sont liés à l'AMP pour activation.

Certains monomères comme des acides aminés non protéinogéniques peuvent également être synthétisés en amont à partir de métabolites primaires pour ensuite être utilisés par la machinerie, ce

qui apporte une diversité supplémentaire (Fischbach and Walsh 2006). C'est le cas pour l'aminomalonyl dans la voie de biosynthèse de la colibactine (Brachmann et al. 2015).

### c. Les enzymes

Les enzymes PKS et NRPS composant la machinerie de biosynthèse sont constituées de différents modules, chacun responsable de l'incorporation d'un monomère (Walsh and Fischbach 2010). Une même enzyme peut comporter plusieurs modules, y compris de nature différente (exemple ClbB possède un module PK et un module NRPS). Ces modules comportent différents domaines, chacun avec une activité catalytique dédiée dont les principales se correspondent entre les PKS et NRPS (Tableau 1). Ainsi chaque module assure *a minima* le recrutement (domaine d'activation), la fixation (domaine de thiolation) et l'incorporation du monomère à l'oligomère en cours d'élongation (domaine de condensation) (Figure 14). Il existe également des domaines optionnels ou accessoires permettant des modifications supplémentaires.

Tableau 1 : Activité et nom des principaux domaines fonctionnels des PK-NRPS

Activité du domaine	Domaine PKS	Domaine NRPS
Domaines porteurs ou de thiolation	ACP : Acyl carrier protein	PCP : Peptidyl carrier protein
Activation du monomère	AT : Acyltransférase	A : Adénylation
Réaction de condensation	KS : Kétosynthase	C : Condensation
Terminaison	Te : Thioestérase	Te : Thioestérase

### d. Logique de l'élongation

Le domaine d'activation (AT ou A) possède une poche qui apporte la spécificité pour sélectionner un monomère en particulier avec plus ou moins de fidélité (Payne et al. 2017). Le monomère sélectionné est ensuite transféré au domaine de thiolation (Figure 14).

Le monomère qui va être incorporé ainsi que l'oligomère déjà formé sont attachés de manière covalente à la machinerie de biosynthèse via les domaines porteurs ou de thiolation (ACP ou PCP) (Fischbach and Walsh 2006). Ces domaines possèdent un « bras » phosphopantéthéinyl avec une fonction thiol (SH) libre qui sert d'ancrage. Ce résidu phosphopantéthéinyl est transféré grâce à l'intervention indispensable d'une 4'-phosphopantéthéinyltransférase (PPTase) qui assure l'activation des enzymes préalable à toute réaction de la machinerie.

Le domaine de condensation (KS ou C) catalyse la réaction permettant la liaison covalente (carbone-carbone pour un domaine KS ou peptidique pour un domaine C d'une NRPS) entre l'oligomère du

module précédent et le monomère nouvellement recruté par le module donné (Figure 14) (Fischbach and Walsh 2006).

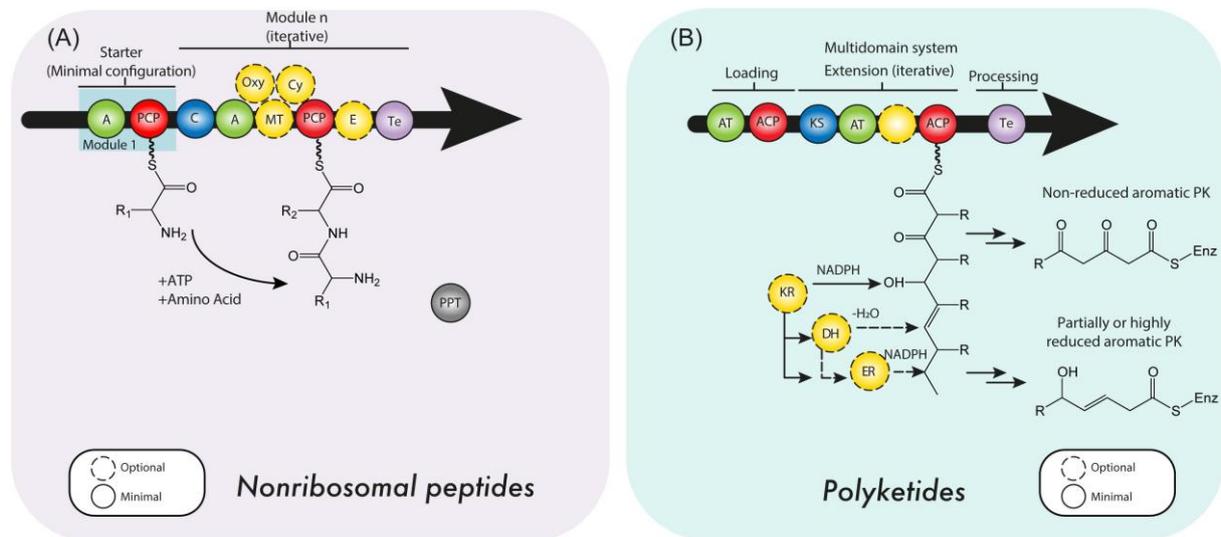


Figure 14 : Fonctionnement des machineries NRPS (A) et PKS (B). NRP : C, domaine de condensation; PCP (peptidyl carrier protein), domaine de thiolation ; A, domaine d'activation (adénylation); Te, domaine thioestérase ; PPT, 4'-phosphopantéthéinyltransférase. Domaines accessoires : E, épimérase; MT, méthyltransférase; Oxy, domaine d'oxydation; Cy, domaine d'hétérocyclisation; PKS : ACP (acyl carrier protein), domaine de thiolation; AT, domaine d'activation (acyltransférase); KS, domaine de condensation (ketosynthase); Te, domaine thioestérase ; Domaines accessoires : KR, domaine ketoréductase; DH, domaine déshydratase; ER, domaine enoyl réductase. (Guzmán-Chávez et al. 2018).

La terminaison consiste en la libération du métabolite synthétisé et repose généralement sur l'intervention d'un domaine thioestérase (Te) (Figure 14).

Il existe des domaines optionnels chez les PKS et NRPS qui vont apporter aux monomères ou à l'oligomère formé des modifications et des variations dans sa structure (domaines épimérase (E) ; d'hétérocyclisation (Cy) ou encore assurant des fonctions d'oxydoréduction) (Figure 14). Des modifications post-assemblage peuvent également apporter de la variabilité (Walsh 2016).

## 2) Application à la colibactine

Le métabolite PK-NRP principal issu de la PK-NRPS codée par l'îlot *pks* est la colibactine, produite initialement sous forme d'une prodrogue, la précolibactine (Figure 15). Sa synthèse nécessite l'intervention de l'ensemble des enzymes de biosynthèse codées par l'îlot. D'autres composés et des intermédiaires « précolibactines » sont également relargués lors du fonctionnement de la machinerie de biosynthèse codée par cet îlot mais les études ont essentiellement porté sur l'élongation complexe à l'origine de la toxine. Le modèle actuel de biosynthèse de la colibactine formant des ponts inter-brins de l'ADN sera présenté ici.

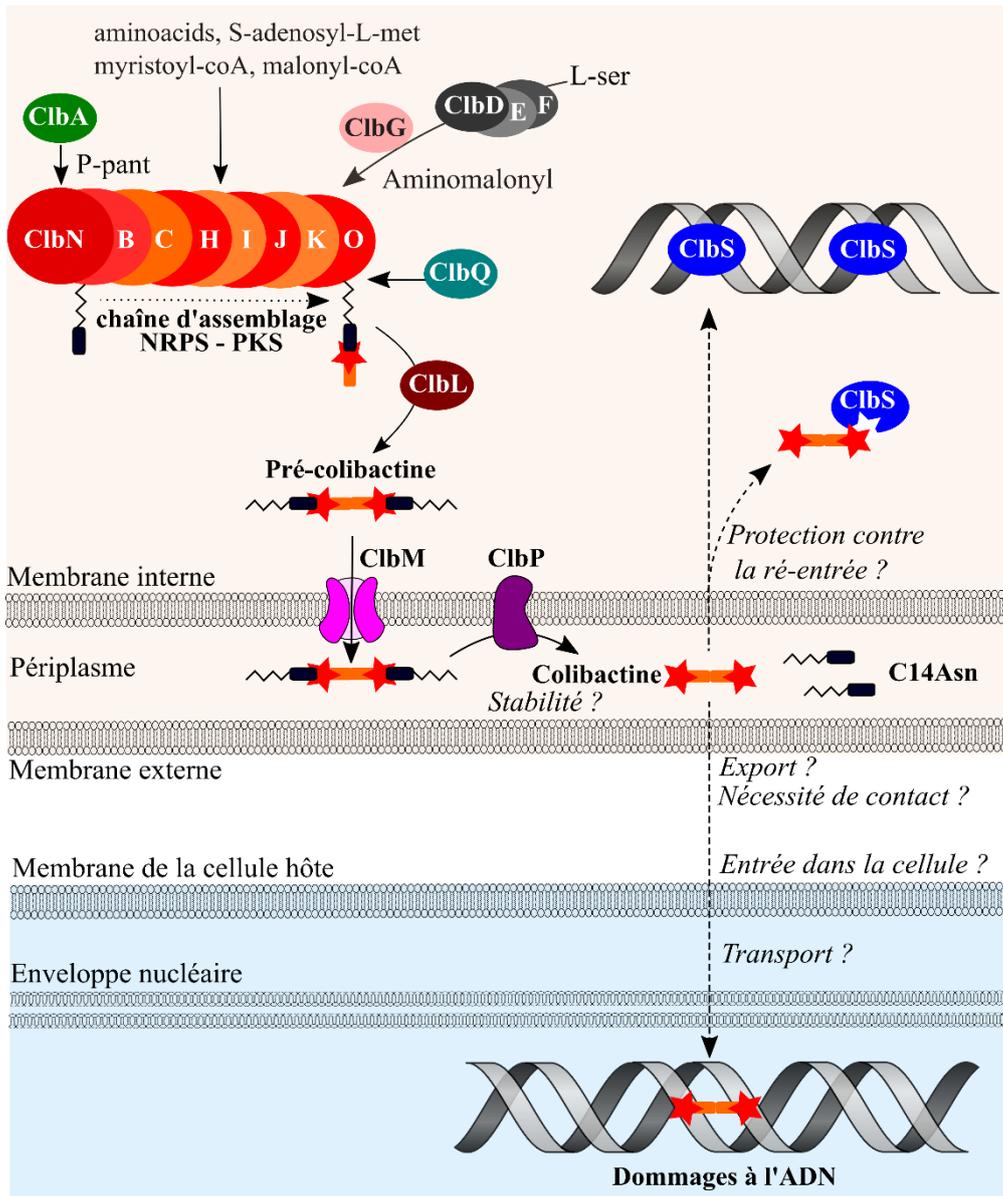


Figure 15 : Schéma général de l'assemblage et de l'export de la colibactine ainsi que de la protection des bactéries vis-à-vis de la génotoxine, d'après Jean-Philippe Nougayrède.

a. Activation de la machinerie

La phosphopantéthéinyl transférase (PPTase) ClbA est indispensable à l'activation de la machinerie de biosynthèse. Elle est responsable de la thiolation post traductionnelle des domaines et est codée par le gène *clbA* (Nougayrède et al. 2006; Martin et al. 2013).

b. Synthèse de la chaîne linéaire

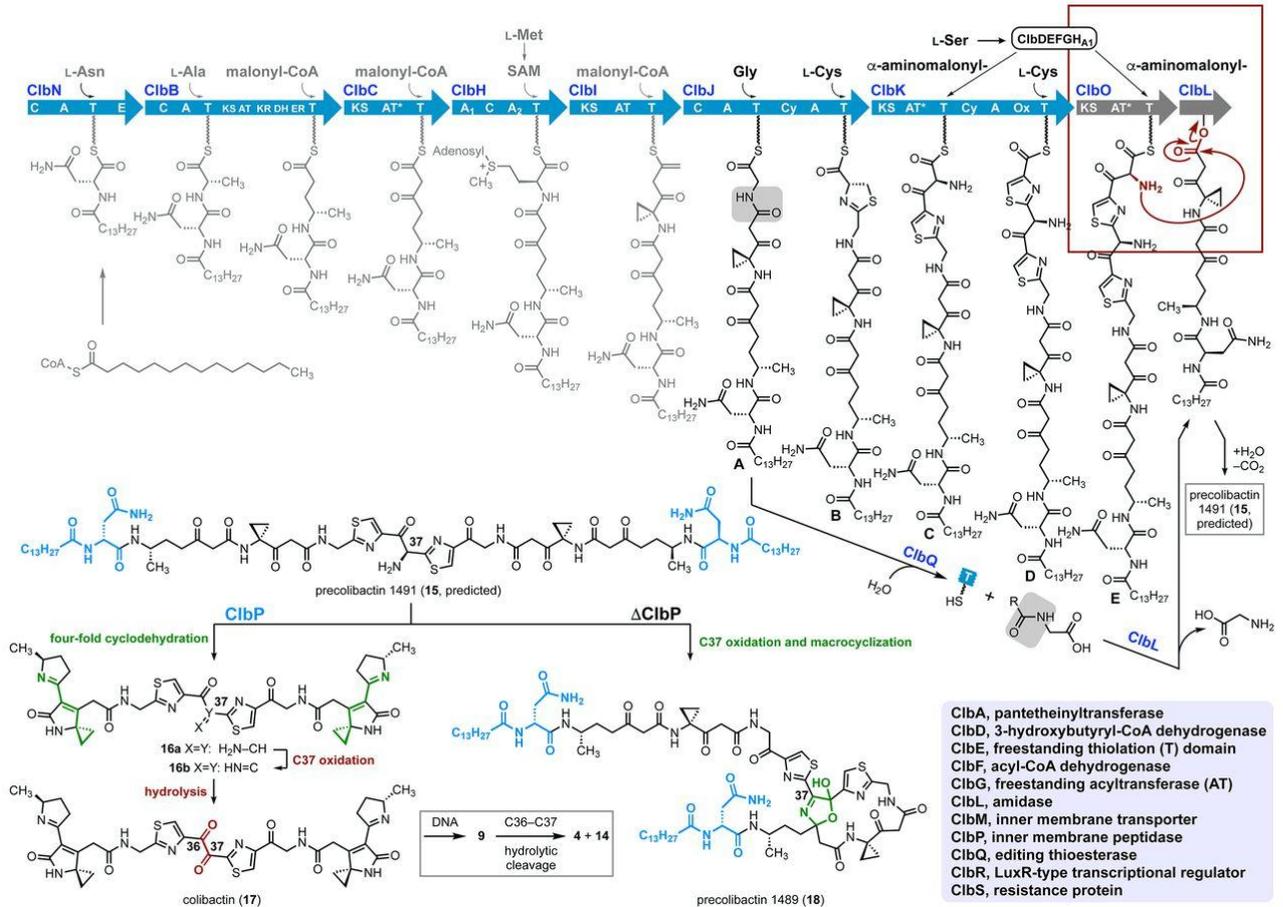


Figure 16 : Schéma de biosynthèse de la colibactine (17) selon Herzon and Crawford. L'oligomère est formé par l'intervention des successive des différentes enzymes (voir texte pour détail). Pour obtenir une forme dimérique de la colibactine, selon eux ClbQ décroche l'intermédiaire issu de ClbJ (A), tandis que ClbL catalyse l'hydrolyse d'une glycine et le couplage de ce nouveau composé avec celui formé par ClbO pour obtenir la précolibactine 1491 (15), actuellement non isolée. Son clivage par ClbP est nécessaire au remaniement pour former les structures électrophiles capables de réagir avec l'ADN (16). Le substitut du carbone 37 serait initialement un groupement amine (prédiction) mais est rapidement oxydé en cétone (la structure exacte de la colibactine qui réagit avec l'ADN au niveau de carbones C36-C37 n'est pas complètement élucidée en raison de sa haute sensibilité à l'oxydation). Abréviations des noms de domaines : A, adenylation; ACP, acyl carrier protein; AT, acyltransferase; AT\*, AT inactivé ; C,condensation; Cy, cyclization; DH, déhydratase; E, épimérase; ER, enoyl reductase; KR, ketoreductase; KS, ketosynthase; Ox, oxydase; PCP, peptidyl carrier protein. D'après (Xue et al. 2019).

La NRPS ClbN est ensuite la première enzyme à intervenir dans la synthèse de la colibactine. Elle reconnaît et active de la L-Asparagine (L-Asn) (Figure 16). Ce module d'initiation possède un domaine d'épimérisation accessoire qui convertit la L-Asn en D-Asn (Brotherton and Balskus 2013). ClbN permet ainsi d'obtenir le précurseur initial N-myristoyl-D-asparagine (ou C14-Asparagine ou C14-Asn) qui sera libéré *in fine* lors du clivage de la précolibactine (Brotherton and Balskus 2013; Bian et al. 2013). Il est ensuite pris en charge par la PK-NRPS ClbB puis la PKS ClbC (Brotherton and Balskus 2013; Vizcaino et al. 2014; Brotherton et al. 2015; Vizcaino and Crawford 2015).

L'élongation se poursuit avec l'incorporation de S-adénosylméthionine par ClbH, permettant la formation par ClbI du cyclopropane qui va constituer la partie réactive de la colibactine (Zha et al. 2017).

ClbJ introduit ensuite deux acides aminés dont le dernier va subir une hétérocyclisation en thiazoline, ensuite oxydé en thiazole par ClbK (Li et al. 2015; Trautman et al. 2017). Le module ClbK<sub>PKS</sub> catalyse l'incorporation d'un substrat original, l'aminomalonyl, synthétisé au préalable par les enzymes accessoires ClbD-E-F et transféré grâce à ClbG (Brachmann et al. 2015; Zha et al. 2016; Li et al. 2016). Le module ClbK<sub>NRPS</sub> catalyse ensuite l'incorporation d'une nouvelle cystéine qui sera oxydée et hétérocyclisée comme celle incorporée par ClbJ (Vizcaino and Crawford 2015; Li et al. 2016; Healy et al. 2016).

L'activité de ClbO est moins formellement déterminée car aucun oligomère linéaire directement issu de son intervention n'a été mis en évidence. A partir des prédictions *in silico* et de la structure de la colibactine finale, la principale hypothèse est que cette PKS catalyserait également l'incorporation d'un second aminomalonyl (Brachmann et al. 2015; Li et al. 2016; Jiang et al. 2019; Xue et al. 2019).

#### *c. Finalisation de la structure dimérique de la précolibactine*

La colibactine présente une activité génotoxique de type formation de ponts inter-brins de l'ADN sous forme de dimère de deux oligomères linéaires préalablement synthétisés. Les dernières étapes de sa synthèse sont encore plutôt mal connues mais il est bien nécessaire d'avoir les gènes *clbL* et *clbQ* pour récapituler l'activité génotoxique. Deux grandes hypothèses se confrontent pour expliquer précisément les mécanismes en cause permettant l'obtention de la structure finale dimérique. La première est celle de l'équipe de Crawford et al. présentée en Figure 16 qui repose sur l'activité de thioestérase de ClbQ permettant de décrocher différents oligomères de la chaîne d'assemblage (Li et al. 2016; Guntaka et al. 2017; Xue et al. 2019).

Balskus et co. ont quant à eux démontré que l'amidase ClbL présentait préférentiellement une activité de formation de ponts amides plutôt qu'une activité d'hydrolyse, ce qui pourrait expliquer la formation d'une liaison entre les oligomères issus de ClbI et ClbO pour former la structure dimérique (Jiang et al. 2019). Néanmoins l'instabilité du produit de ClbO pose problème pour élucider précisément la réaction en cause et les auteurs ne proposent pas de rôle à ClbQ, pourtant nécessaire pour observer l'activité génotoxique.

#### *d. Transport vers le périplasme*

La machinerie de biosynthèse est complétée par une pompe d'efflux codée par *clbM*. Elle permet le transport de la colibactine du cytoplasme vers le périplasme (Mousa et al. 2016, 2017). Cette pompe

périplasmique comportant 12 segments transmembranaires appartient à la famille des transporteurs MATE (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*). Son fonctionnement nécessite de l'énergie et est couplé au transport des ions (Mousa et al. 2016, 2017).

Notons à cette occasion que les mécanismes à l'origine du relargage extracellulaire de la colibactine « active » à partir du périplasme restent à ce jour inconnus, *a fortiori* ceux de l'entrée de la colibactine au sein des cellules eucaryotes. L'activité génotoxique liée à la colibactine n'est cependant pas retrouvée à partir de surnageants de culture suggérant soit l'instabilité de la molécule soit la nécessité d'un contact étroit (Nougayrède et al. 2006) (Figure 15).

#### *e. Clivage*

Le clivage de la prodrogue précolibactine est réalisé par la peptidase ClbP. Il libère les N-acyl-D-asparagine fixés sur le squelette de la colibactine à la toute première étape de la biosynthèse par ClbN (notamment le C14-Asparagine ou C14-Asn) (Brotherton and Balskus 2013; Bian et al. 2013). Le clivage par ClbP est nécessaire au remodelage de la molécule de colibactine mature pour lui donner sa forme active. En son absence, des cyclisations alternatives surviennent, notamment la formation de pyridones non génotoxiques ou la formation de macrocycles (Healy and Herzon 2017) (Figure 16). ClbP est une peptidase périplasmique composée de trois domaines : (i) un domaine C-terminal comportant trois hélices transmembranaires ancrées dans la membrane interne ; (ii) un résidu N-terminal qui est clivé et permet l'adressage périplasmique ; (iii) un large domaine périplasmique comportant le site catalytique (Dubois et al. 2011; Cougnoux et al. 2012; Brotherton and Balskus 2013).

La connaissance de ClbP et de son rôle essentiel dans la maturation de la colibactine ont engendré deux applications parallèles : (i) le développement de sondes fluorescentes clivées par ClbP pour détecter son activité avec un potentiel pour cribler des inhibiteurs ou détecter des isolats producteurs de colibactine (Hirayama et al. 2019; Volpe et al. 2019) (ii) le développement d'inhibiteurs de ClbP destinés à prévenir la génotoxicité liée à la colibactine comme des dérivés d'acides boriques testés *in vitro* et *in vivo* dans un modèle d'anses ligaturées de colon et de colite associée au cancer (AOM/DSS) (Cougnoux et al. 2016).

#### *f. Protection*

Le mécanisme d'activation reposant sur la synthèse d'une prodrogue inactive clivée par une peptidase au niveau du périplasme et non du cytoplasme est un mécanisme d'autoprotection, existant lors de la synthèse d'autres métabolites secondaires comme la zwittermicin A ou les xénocoumacines (Brotherton and Balskus 2013).

L'îlot *pks* code également pour une protéine de résistance à la colibactine, ClbS. Elle n'est pas nécessaire à l'activité génotoxique, mais protège les bactéries productrices de génotoxine de l'autotoxicité induite par cette dernière (Bossuet-Greif et al. 2016). Elle agit grâce à une activité cyclopropane hydrolase spécifique, qui convertit le cyclopropane de la colibactine indispensable à la réactivité vis-à-vis de l'ADN en produit inactif (Tripathi et al. 2017). De plus, ClbS peut se fixer à l'ADN et pourrait ainsi apporter une protection vis-à-vis d'autres toxines et nucléases au-delà de la colibactine (Molan et al. 2019; Tripathi and Bruner 2021) (Figure 15).

*g. Mécanismes de régulation*

La machinerie *pks* est soumise à une régulation fine dont la connaissance prend tout son sens pour envisager les conditions *in vivo* propices à la synthèse de la génotoxine, qui pourront ouvrir la voie également à la compréhension de son rôle physiopathologique et de ses conséquences. Différents niveaux de régulation classique ont ainsi été montrés (transcription, traduction, ou encore stabilité des enzymes Clb via des chaperones comme HtpG (Garcie et al. 2016)) et répondent à des conditions environnementales plus ou moins identifiées.

Il existe un activateur transcriptionnel spécifique et essentiel de la voie *pks* codé par l'îlot : ClbR (Wallenstein et al. 2020). La surexpression de ClbR induit la surexpression de différents gènes de l'îlot *pks*, dont *clbR* lui-même, ainsi que la production de colibactine. L'expression de *clbR* est donc autorégulée mais également influencée par l'environnement comme la concentration en fer (Homburg et al. 2007; Wallenstein et al. 2020).

Dans l'environnement, le fer joue en un rôle majeur dans la régulation de la production de la colibactine en particulier sur *clbA*. Deux acteurs médient cette régulation : le régulateur transcriptionnel sensible au fer Fur (*ferric uptake regulator*) et le petit ARN non codant RhyB à l'origine d'une régulation post-transcriptionnelle des ARNm (Tronnet et al. 2016, 2017). Les sources de carbones disponibles influencent également l'expression d'enzymes *pks* (Homburg et al. 2007) de même que la présence d'oligosaccharides comme l'inuline (Oliero et al. 2021). Cette régulation pourrait être liée à l'intervention du régulateur Csr (*carbone storage regulator*) mais également modifier le métabolisme primaire et la disponibilité en précurseurs. Il faut en effet souligner l'impact potentiellement important de la composition du milieu et de l'environnement en métabolites primaires nécessaires à l'élongation par la machinerie *pks*.

L'enzyme bactérienne PPK (*polyphosphate kinase*) est nécessaire à l'expression du gène *clbB* (Tang-Fichaux et al. 2020). De manière intéressante, la mésalamine, utilisée comme traitement des maladies chroniques inflammatoires de l'intestin, est un inhibiteur de PPK et diminue la production de colibactine (Tang-Fichaux et al. 2020). Enfin, bien que le mécanisme ne soit pas clairement

élucidé, les polyamines et en particulier la spermidine semblent également importantes pour l'expression de certaines enzymes Clb et la production de colibactine (Chagneau et al. 2019)<sup>1</sup>.

### C) Les métabolites produits par la voie *pks*

Comme pour les mécanismes de régulation, les études concernant les effets biologiques ou la biosynthèse liés à l'îlot *pks* se sont majoritairement focalisées sur la colibactine génotoxique à l'origine de la formation de ponts inter-brins de l'ADN. Cependant, il apparaît de plus en plus évident que l'îlot *pks* n'est pas impliqué dans la synthèse d'un métabolite unique mais plutôt d'un cocktail de métabolites avec de potentielles activités biologiques, y compris d'autres formes de colibactines. On peut faire l'hypothèse assez plausible que tous n'ont pas été découverts. En particulier le répertoire et les quantités de ces molécules d'intérêt pourraient assez logiquement dépendre de régulations et donc à la fois de l'environnement des bactéries et de la réponse de ces dernières à l'environnement. Ce répertoire pourrait être aussi influencé par le fond génétique de la souche bactérienne en cause, tout en considérant que l'îlot en lui-même est très conservé mais peut présenter quelques SNP importants. D'autres métabolites peuvent provenir du fonctionnement des enzymes PK-NRP Clb qui peuvent être peu fidèles et peuvent accepter différents monomères (Brotherton and Balskus 2013). Des produits issus du dérèglement de la machinerie ou du contrôle qualité réalisé par ClbQ peuvent également être relargués (Guntaka et al. 2017). Dans ce paragraphe seront présentés les métabolites avec une activité biologique précédemment décrits.

---

<sup>1</sup> Ce travail, pour lequel je suis première auteure de l'article correspondant, ne sera pas détaillé dans le manuscrit car ne faisant pas partie de mon travail central de thèse.

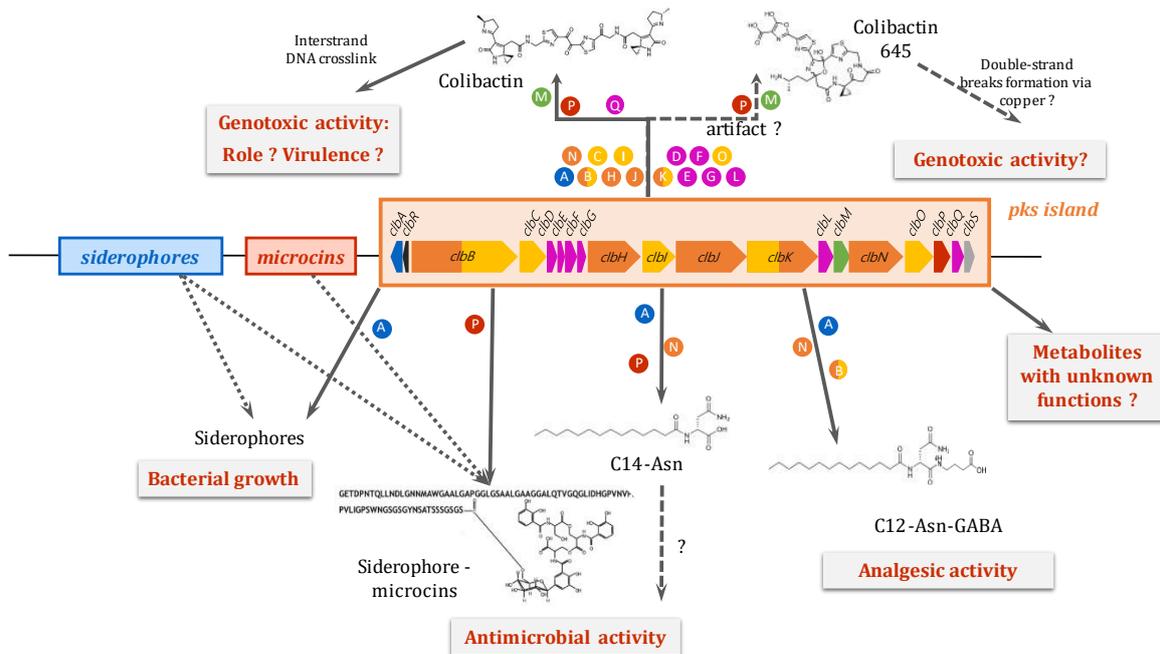


Figure 17 : Les métabolites produits par la voie pks. La voie pks permet la synthèse de la colibactine génotoxique mais également potentiellement de d'autres formes de colibactines (colibactines macrocycliques comme la colibactine 645, dont l'activité génotoxique est discutée). Parmi ceux actuellement identifiés, il existe des aminolipides comme le C14-Asn et le C12-Asn-GABA avec activité biologique. L'îlot pks est également en lien étroit avec d'autres îlot de pathogénicité et certaines enzymes participent à la synthèse de métabolites tels que les sidérophores ou sidérophores microcins.

## 1) La colibactine

### a. Démarches d'élucidation de la structure utilisées

Comme nous l'avons vu, la biosynthèse de la colibactine est complexe. Depuis la découverte de l'îlot *pks* en 2006, différentes équipes de chimistes se sont efforcées d'élucider cette biosynthèse et la structure de LA colibactine génotoxique. Plus qu'une colibactine, il existe en fait vraisemblablement des colibactines plus ou moins élaborées et de structure et donc d'activité différentes. La ou les colibactines génotoxiques sont très réactives et probablement produites en faible quantité ce qui a tenu en échec jusqu'à récemment toute tentative d'isolement et d'élucidation structurale (Zhou et al. 2021). Les équipes de chimistes ont travaillé à élucider des structures de précolibactines, plus stables, déduisant ensuite celle des colibactines. Les études ont été réalisées d'abord sur différents mutants de gènes de l'îlot *pks* ( $\Delta clbP$  notamment) afin d'accumuler certains intermédiaires en amont des enzymes délétées pour en déterminer la structure. Cependant, cette approche induit des biais importants dans l'élucidation structurale car l'interruption d'une étape de la biosynthèse perturbe le cheminement et l'élongation de l'oligomère et induit potentiellement des « erreurs » ou redirige la biosynthèse vers des métabolites qui n'auraient normalement pas été produits. Par exemple la persistance du C14-Asn chez un mutant  $\Delta clbP$  entraîne des cyclisations donnant lieu à des interprétations erronées (Healy et al. 2016; Healy and Herzon 2017) (Figure 16).

Afin de déterminer la structure de ces différentes molécules, des approches de métabolomique comparative entre une souche mutante et une souche sauvage (*pathway* et *domain-targeted metabolomic*), d'enzymologie, de résonance magnétique nucléaire, d'isolement à partir de grands volumes de cultures, ou encore de synthèse d'analogues... ont été utilisées. L'analyse en spectrométrie de masse de culture additionnée de précurseurs marqués par des isotopes (comme le carbone 13) a également permis d'avancer sur l'élucidation de la chaîne de biosynthèse et de la structure.

C'est la découverte successivement que la colibactine pouvait alkyler l'ADN et également faire des ponts inter-brins de l'ADN qui a permis d'utiliser cette affinité pour l'ADN pour la purifier sous forme d'adduits à l'ADN et déterminer ainsi sa structure (Vizcaino and Crawford 2015; Bossuet-Greif et al. 2018). Une molécule consensuelle a ainsi été récemment isolée (Figure 16) (Wilson et al. 2019; Xue et al. 2019). Deux approches ont été utilisées en parallèle par des équipes différentes. Premièrement, de l'ADN avec des ponts inter-brins induit par *E. coli pks+* cultivés avec des précurseurs amino-acides marqués (isotopes stables) intégrés dans la structure de la colibactine a été utilisé comme support d'analyse après digestion. L'analyse de ces fragments en chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) a permis de mettre en évidence des monoadduits adénine-colibactine puis dans un second temps des bi-adduits adénine-colibactine dimérique, impliqués dans le crosslink de l'ADN (Xue et al. 2018, 2019). Dans le même temps, le même adduit a été retrouvé en utilisant une approche d'adductomique non dirigée, qui permet la détection de molécules qui perdent lors de leur fragmentation en spectrométrie de masse l'équivalent d'une base d'ADN, comme c'est le cas d'adduits (Wilson et al. 2019).

#### *b. Relation structure-activité*

La réactivité de la colibactine s'explique par des particularités structurales. Ce sont les cyclopropanes (cycles à trois carbones) de la tête réactive qui vont permettre l'alkylation des bases de l'ADN via l'ouverture de ce cycle très réactif (Figure 18 A) (Xue et al. 2018). Les imines insaturées adjacentes formées lors du réarrangement de la molécule après le clivage par ClbP augmentent fortement la réactivité du cyclopropane vis-à-vis de l'ADN (Figure 16 & Figure 18 A) (Healy and Herzon 2017). Cette réaction peut avoir lieu avec les deux têtes réactives présentes sur la molécule de colibactine finale dimérique et aboutir à la formation d'un bi-adduit (Figure 18 B) (Wilson et al. 2019; Xue et al. 2019).

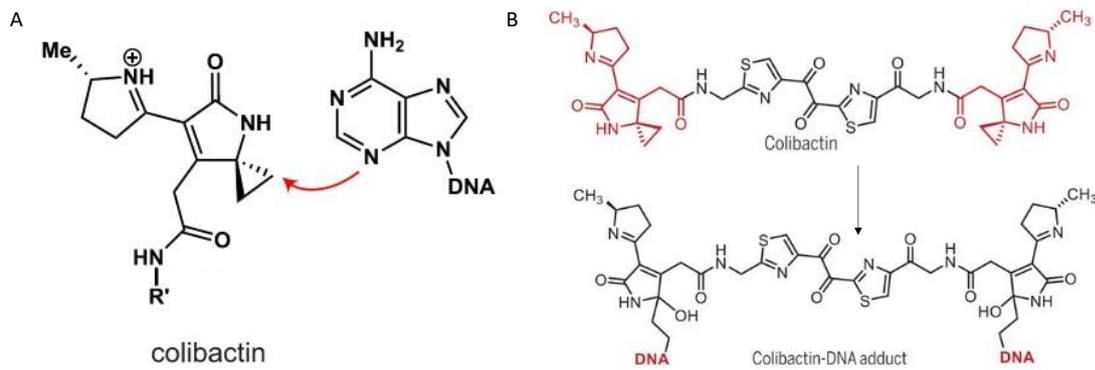


Figure 18 : Réactivité de la colibactine vis-à-vis de l'ADN. A. La tête réactive comportant le cyclopropane constitue un réactif électrophile qui réagit avec les nucléotides (ici l'adénine) pour former un adduit d'après (Wilson et al. 2019) B. Structure de la colibactine comportant deux tête réactives et de la colibactine formant un bi-adduit à l'ADN. D'après (Xue et al. 2019).

La colibactine est ainsi capable de former des bi-adduits au sein d'une double hélice d'ADN, constituant des ponts inter-brins. Le reste de la structure, composée notamment des deux hétérocycles centraux, permet l'intercalation de la colibactine au sein de l'hélice. Ce phénomène dépend à la fois de la forme de la colibactine et de la forme mais également de la charge et de la flexibilité de l'hélice de l'ADN (variable en fonction de la séquence de nucléotides). A partir des caractéristiques des sites de cassures double-brin liées à la colibactine retrouvés après infection de cellules et de la structure de la génotoxine, l'équipe de Meyer et al. a modélisé la formation de ponts inter-brins et les séquences préférentiellement ciblées (Dziubańska-Kusibab et al. 2020). Ainsi ils ont modélisé que la colibactine s'intercalait de manière stable dans le sillon mineur de la double hélice d'ADN et pouvait ainsi réagir avec deux adénines sur chacun des brins d'ADN espacées de deux à trois nucléotides (de préférence des adénines ou thymines pour favoriser la stabilité) (Figure 19). C'est donc un motif AAWWTT qui semble ciblé de manière privilégiée. Ces séquences riches en AT montrent aussi une topologie particulière qui favoriserait l'insertion de la colibactine dans le sillon mineur.

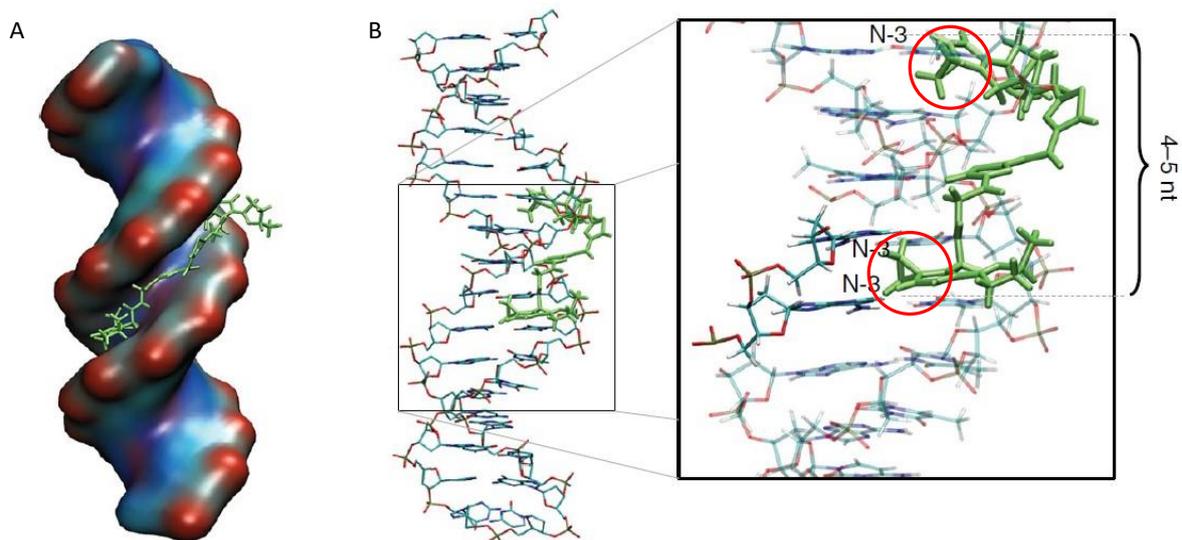


Figure 19 : Réactivité de la colibactine vis-à-vis de la double hélice d'ADN. A. La colibactine s'insère dans le sillon mineur de la double hélice d'ADN. B. Les têtes réactives de la colibactine (cercle rouge) peuvent réagir avec les atomes d'azote N3 de deux adénines situées sur les brins opposés d'ADN et distantes de 2 à 3 bases. Modèle d'après (Dziubańska-Kusibab et al. 2020).

### c. Les colibactines macrocycliques

En 2016, il a été mis en évidence des précolibactines présentant un macrocycle, notamment la précolibactine-886 (Figure 20) (Li et al. 2016). Cette structure a été isolée de cultures de *E. coli* mutants  $\Delta cIbP \Delta cIbQ$ . Une autre équipe a plus récemment tenté la synthèse totale de ce composé qui s'avère difficile (Healy et al. 2019). En particulier, ils n'obtiennent la formation du macrocycle que durant la purification en chromatographie liquide haute performance (HPLC), arguant ainsi qu'il s'agirait plutôt d'un artefact lors de l'analyse de surnageants bactériens. De plus, le produit du clivage de cette précolibactine cyclique par la peptidase ClbP induit également la production d'une « colibactine » peu stable qui est rapidement dégradée en pyridone non génotoxique.

En parallèle, l'équipe ayant isolé initialement la précolibactine-886 a poursuivi ses travaux et mis en évidence une nouvelle précolibactine macrocyclique, la précolibactine-969, qui nécessite en plus l'intervention de ClbO et ClbL (mais toujours pas de ClbQ) (Figure 20 & Figure 17) (Li et al. 2019). Elle est retrouvée en faibles concentrations dans des cultures de *E. coli* CFT073 et son clivage par ClbP libère la colibactine 645 conservant le macrocycle. Bien que *in vitro* colibactine-645 et précolibactine-969 induisent toutes deux des cassures double-brins d'ADN plasmidique, seules les cellules exposées à la colibactine-645 présentent des dommages à l'ADN : le clivage par ClbP pourrait ainsi favoriser l'entrée dans les cellules du composé. Cette activité est dépendante de la présence de cuivre Cu(II). Les auteurs proposent un nouveau type d'activité où des cassures double-brin de l'ADN seraient formées directement en présence du complexe colibactine-645 – Cu(I) à l'origine d'espèces réactives

de l'oxygène (comme H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), proche de l'effet génotoxique décrit pour la bléomycine (Avendaño and Menéndez 2015).

Controversés, ces composés macrocycliques pourraient être avant tout minoritaires, du fait notamment de leur instabilité (qui dépend de la présence de cations ou de chélateurs dans le milieu), rendant difficile leur isolement, mais contribuent cependant à l'activité biologique de la colibactine. Ils complexifient la diversité du cocktail de colibactines et métabolites produits et pourraient potentiellement expliquer certaines différences entre des souches de *E. coli pks+*. Li *et al.* ont en effet retrouvé les précolibactines macrocycliques 886 et 969 dans des cultures de l'uropathogène *E. coli* CFT073 mais pas du probiotique *E. coli* Nissle1917, deux souches pourtant très proches génétiquement appartenant toutes deux au ST73 (Li *et al.* 2016).

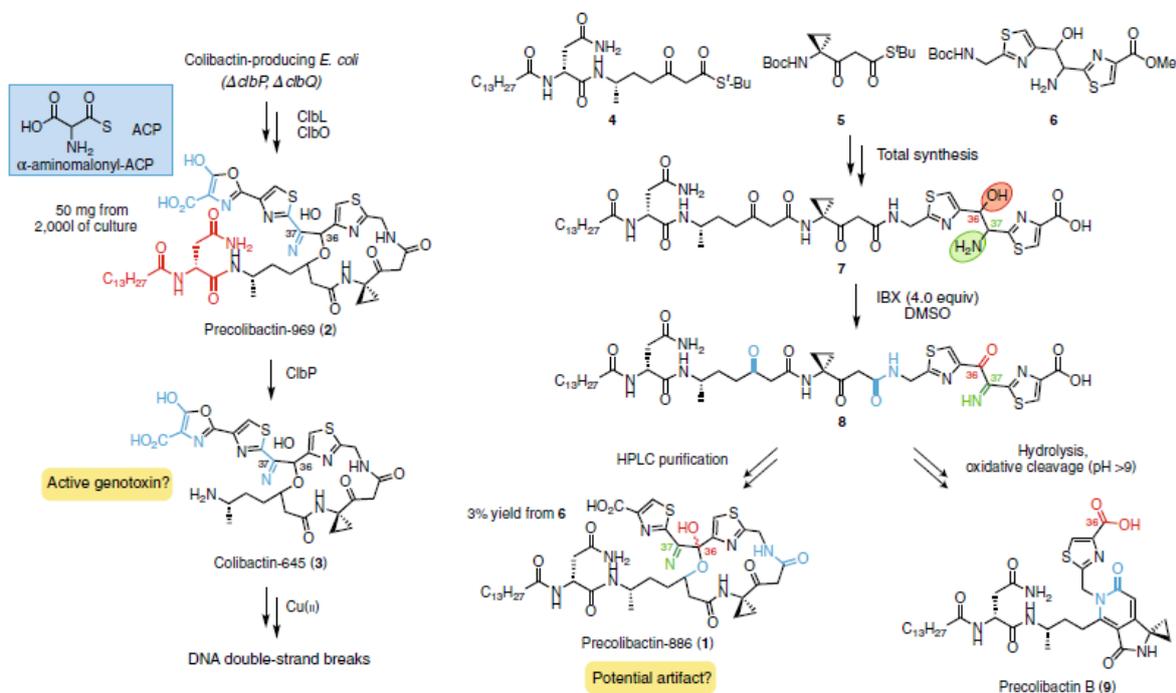


Figure 20 : Les colibactines macrocycliques. La précolibactine-886 (1) est le premier macrocycle découvert. Plus récemment, l'équipe de Qian a mis en évidence la précolibactine-969 (2), plus complexe et qui nécessite l'intervention de ClbL et ClbO. Son clivage par ClbP libère la colibactine macrocyclique-645 (3) qui induit des cassures double brin de l'ADN. L'équipe de Crawford a en parallèle réalisé la synthèse du précurseur de la précolibactine-886 (8). Dans leurs conditions expérimentales, ce métabolite s'hydrolyse rapidement en précolibactine B (9), non génotoxique. La formation du macrocycle n'a été observée que dans des proportions mineures durant la purification par HPLC. D'après (Carlson and Balskus 2019).

## 2) Les aminolipides

### a. Le C14-Asn

La synthèse de la colibactine libère des intermédiaires de biosynthèse avec une potentielle activité biologique, notamment des métabolites lipidiques. Ainsi, lors du clivage de la précolibactine en

colibactine, le N-myristoyl-D-Asparagine (ou C14-Asparagine ou C14-Asn ou produit de clivage), synthétisé par ClbN à l'étape initiale, est libéré lors du clivage par ClbP (Figure 16, partie bleue de la précolibactine, clivée par ClbP & Figure 17) (Vizcaino et al. 2014). Ce métabolite stable et quantifiable en LC-MS/MS est donc le reflet de la production de colibactine et utilisé comme tel.

Il présenterait des propriétés biologiques propres comme par exemple une inhibition de la croissance de *Bacillus subtilis*. Il s'agit également d'un antagoniste modéré des récepteurs à la dopamine D5 et à la 5-hydroxytryptamine-7 (Vizcaino et al. 2014).

#### b. Le C12-Asn-GABA

Un autre aminolipide a été décrit : il s'agit du C12-Asn-GABA (ou C12-Asparagine-GABA (acide  $\gamma$ -amino-butyrique)) (Figure 17) (Pérez-Berezo et al. 2017). Le mécanisme de sa biosynthèse par la machinerie *pks* n'est pas complètement élucidée mais il nécessite au moins les gènes *clbA*, *clbB* et *clbN* de fonctionnels pour être produit, au contraire de *clbC* et *clbP*. Sa production pourrait reposer sur la faible fidélité de ces enzymes capables d'utiliser des monomères alternatifs à ceux impliqués dans la biosynthèse de la colibactine.

Dans un modèle d'hypersensibilité viscérale digestive, l'administration de ce métabolite resynthétisé en laboratoire à forte dose induit une activité antidouleur. Expérimentalement, grâce à sa partie lipidique, le C12-Asn-GABA traverse l'épithélium intestinal contrairement au neuromédiateur GABA seul. Il inhibe ensuite le flux calcique neuronal via le récepteur GABA<sub>B</sub>. Ainsi, il permet de diminuer l'initiation du signal douloureux par le neurone afférent suite à une stimulation locale douloureuse (relargage de médiateurs comme l'histidine, la sérotonine, la bradykinine...) (Pérez-Berezo et al. 2017).

### 3) Connexion avec d'autres îlots de pathogénicité

Par interaction fonctionnelle avec d'autres îlots de pathogénicité, l'îlot *pks* est impliqué également dans la synthèse d'autres métabolites d'intérêt biologique.

#### a. Les sidérophores

Chez *E. coli*, les sidérophores entérobactine, salmochélines et yersiniabactine sont comme la colibactine des métabolites de la famille des PK-NRP ou NRP. Les enzymes multimodulaires de biosynthèse nécessitent l'activation par une PPTase. La PPTase EntD, présente chez tous les *E. coli*, permet la synthèse de l'entérobactine (qui peut ensuite être glycosylée en salmochélines grâce à des

enzymes codées par des gènes situés sur l'îlot de pathogénicité *iro*) et de la yersiniabactine (Martin et al. 2013). Deux PPTases impliquées dans la synthèse de métabolites secondaires ont donc été décrites chez *E. coli* : ClbA, codée par l'îlot *pks*, et EntD, sur la partie conservée du génome. Martin et al. ont montré que ClbA pouvait se substituer à EntD pour la synthèse de sidérophores, mais pas l'inverse (Martin et al. 2013)(Figure 21). Il existe donc une connexion importante entre îlot *pks* et sidérophores puisque ClbA peut intervenir dans la synthèse de ces derniers.

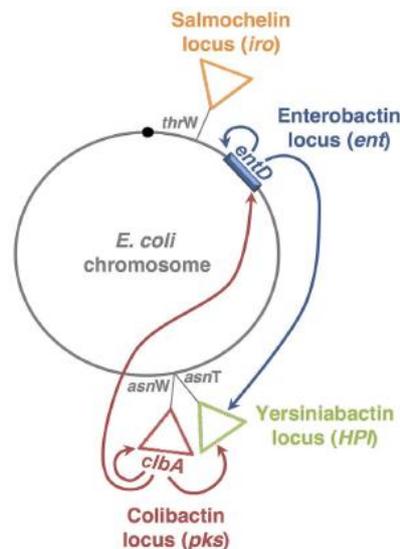


Figure 21 : Connexion par les phosphopanthéthéinyl transférases entre îlot *pks* et sidérophores. Chromosome d'un *E. coli* du groupe phylogénétique B2 avec les différents loci codant pour les sidérophores et l'îlot *pks* représentés. Les flèches illustrent la capacité de certaines PPTases de se substituer aux autres. D'après (Martin et al. 2013).

De plus, îlot *pks* et production de sidérophores sont soumis à des mécanismes de régulations communs comme les concentrations en fer (Tronnet et al. 2016, 2017) ou encore la protéine chaperone HtpG indispensable à la production de la yersiniabactine et de la colibactine (Garcie et al. 2016). Ce lien fonctionnel étroit se matérialise également par l'insertion chromosomique des îlots de pathogénicité *pks* et HPI (*high pathogenicity island*, codant pour la yersiniabactine) qui sont généralement très proches (Figure 21). Leur association semble avoir largement été co-sélectionnée durant l'évolution et ils pourraient même provenir du même élément génétique mobile initialement (Auvray et al. 2021; Wami et al. 2021).

#### b. Les sidérophores-microcines

Les sidérophores-microcines sont une famille de métabolites bactériens à activité antibactérienne produits par des entérobactéries. Ils sont composés d'une partie peptidique qui donne l'activité toxine (microcine) reliée à une partie NRP de structure dérivée du sidérophore entérobactine (Figure 17 & Figure 22) (Vassiliadis et al. 2010). Cette dernière leur permet d'agir comme un cheval de Troie et de pénétrer dans le cytoplasme des bactéries cibles via leur récepteur au sidérophore. Les gènes

qui codent pour les enzymes impliquées dans toutes les étapes de la synthèse des microcines (production, export, modifications post-traductionnelles, immunité) sont regroupés dans des îlots de pathogénicité. Certaines souches de *E. coli* comportent un îlot tronqué pour la synthèse des microcines M et H47, sans les gènes dédiés aux modifications post-traductionnelles de la microcine pour l'attachement du sidérophore. L'activité sidérophores-microcines de ces souches peut cependant être restituée par l'action d'une part par la glycosyltransférase IroB (du locus *iro* pour la synthèse de la salmochéline) et d'autre part par la peptidase ClbP de l'îlot *pks* (Massip et al. 2019). Seule la partie transmembranaire de ClbP (sans activité peptidase en elle-même) est nécessaire pour assurer la production des sidérophores-microcines (Massip et al. 2019). L'hypothèse mécanistique principale est un rôle de co-facteur dans l'export de ces dernières (Figure 22). Il existe ainsi une synergie fonctionnelle entre les îlots microcine tronqué, *pks* et locus *iro*. Cette association est retrouvée et semble avoir été sélectionnée chez plusieurs souches dont le génome est publié (Massip et al. 2019).

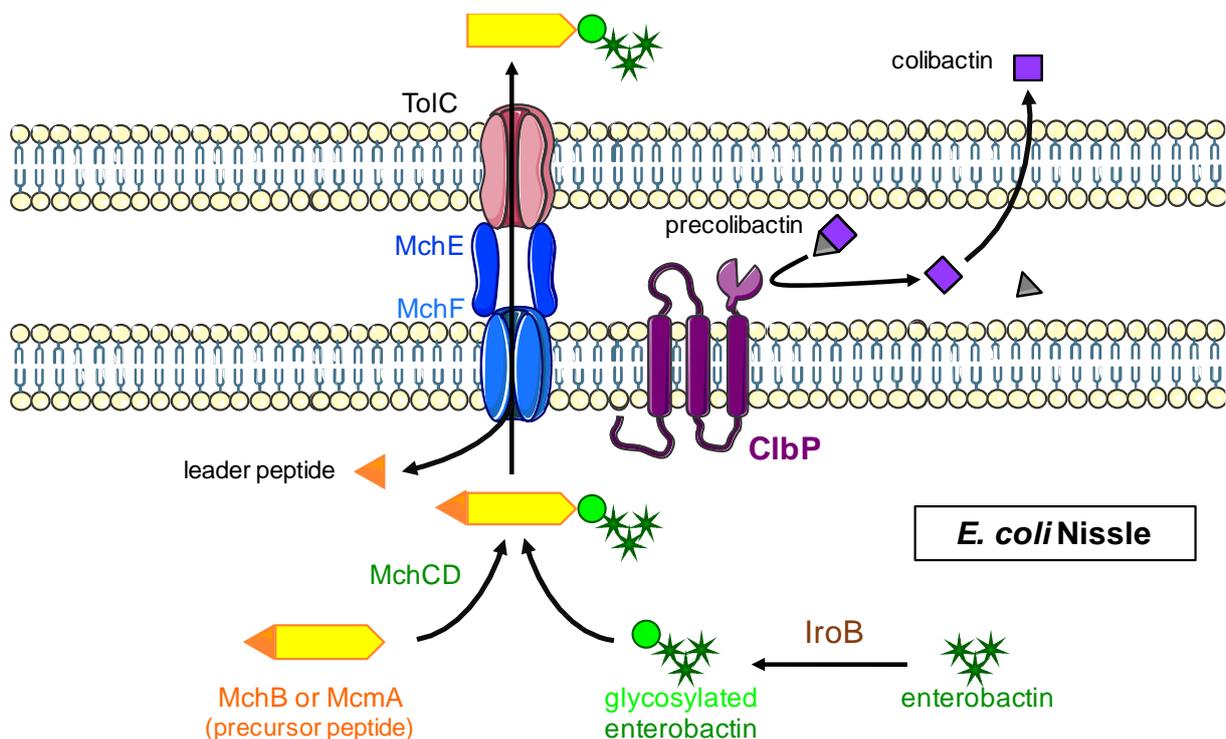


Figure 22 : Modèle proposé pour la biosynthèse des sidérophores-microcines H47 et M chez *E. coli* Nissle1917. Le sidérophore entérobactine, précurseur de la partie sidérophore, est d'abord modifié par la glycosyltransférase IroB puis couplé au peptide microcine MchB ou McmA grâce à l'intervention du complexe MchD. Lors de l'export par la pompe MchEF-ToIC, il y a clivage d'un peptide leader pour donner la forme active du sidérophore-microcine. Il est proposé que la partie C-terminale transmembranaire de ClbP joue le rôle de cofacteur dans cet export, tandis que son extrémité N-terminale porte l'activité peptidase nécessaire à la maturation de la colibactine (Massip et al. 2019).

D) L'îlot *pks* : quels effets et quelles conséquences sur l'hôte ?

## 1) Effet génotoxique de la colibactine et cancer

### a. Dommages à l'ADN et activation de voies de réparation

Comme nous l'avons vu précédemment, la colibactine, grâce à sa structure dimérique, est capable de former des ponts inter-brins de l'ADN (Bossuet-Greif et al. 2018). Initialement ce sont cependant des cassures double-brin de l'ADN qui avaient été mises en évidence (Nougayrède et al. 2006). Elles peuvent dériver des ponts inter-brins par différents mécanismes : (i) lors de la réparation des ponts inter-brins par la voie de Fanconi (*Fanconi anemia*, FA) induite pour répondre aux dommages à l'ADN lors de la réplication (Bossuet-Greif et al. 2018) ; (ii) lors d'une dépurination indépendante de la réplication des bases alkylées à l'origine de sites abasiques (Xue et al. 2020) ; (iii) si formation potentiellement d'espèces réactives de l'oxygène à l'origine de dommages aspécifiques (en lien avec ce dernier mécanisme, rappelons que d'autres formes de colibactines macrocycliques sont également proposées qui induiraient directement des cassures double-brin en présence de cuivre (Li et al. 2019)) ; (iv) lors du stress réplicatif où la collision des fourches de réplication au niveau des ponts inter-brins sont connues pour générer des cassures double-brins site à la formation de structure aberrantes (Zeman and Cimprich 2014) (Figure 23).

Les cassures double-brin comme les ponts inter-brins de l'ADN et le stress réplicatif qui en résultent activent des kinases importantes qui vont orchestrer la réponse aux dommages à l'ADN : ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad3-related kinase*), plus sensible aux blocages des fourches de réplication et ATM (*ataxia-telangiectasia mutated kinase*) répondant plutôt aux cassures double-brins (Figure 23). Via la phosphorylation, elles favorisent le recrutement d'acteurs de signalisation au niveau des dommages (pH2AX, pRPA32...) et de réparation de l'ADN (FA et NHEJ (*non-homologous end joining*)) tout en suspendant la poursuite du cycle cellulaire via une action sur Chk1/2 (*check point kinases*) (Nougayrède et al. 2006; Cuevas-Ramos et al. 2010; Bossuet-Greif et al. 2018).

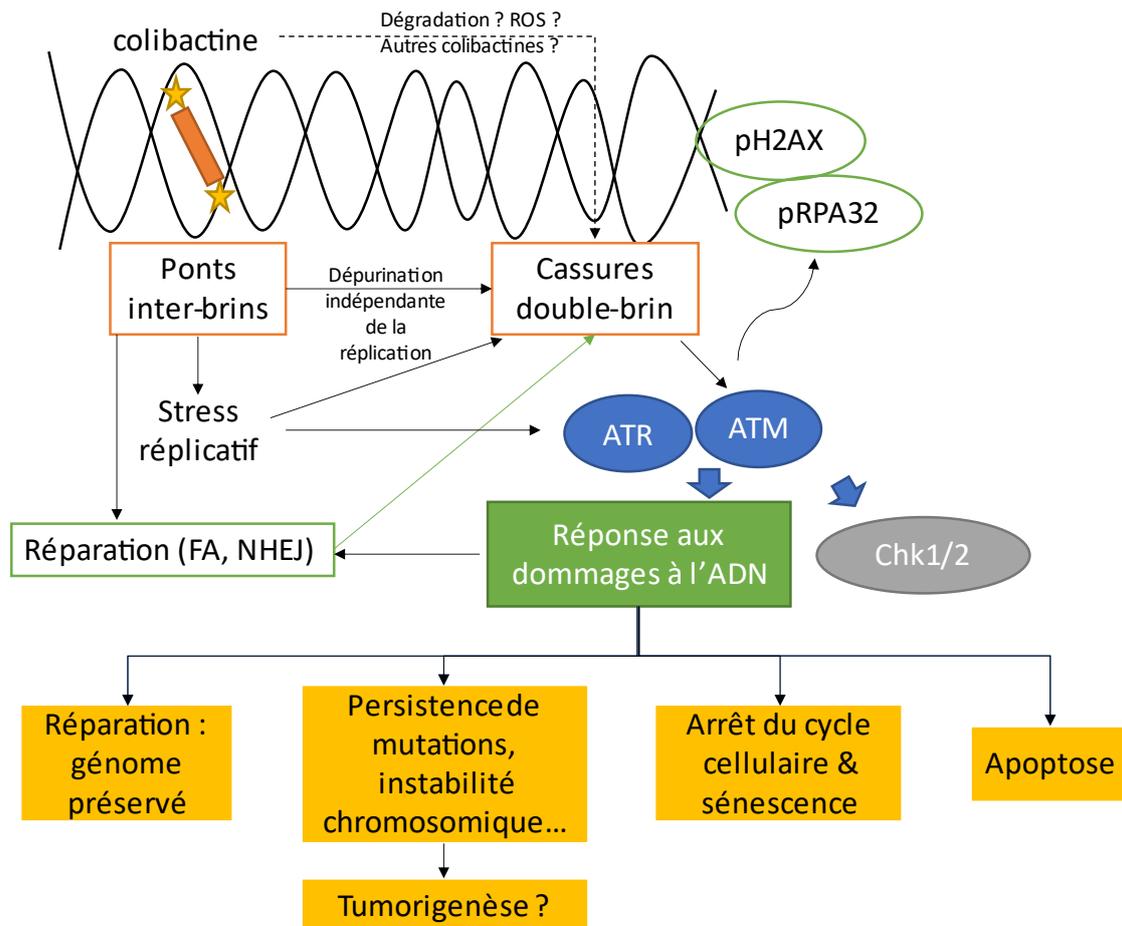


Figure 23 : Dommages à l'ADN liés à la colibactine et conséquences. La colibactine forme des ponts inter-brins de l'ADN mais peut indirectement voire directement induire des cassures double-brin. Ces dommages sont détectés par la cellule qui active la réponse aux dommages de l'ADN orchestrées par ATM et ATR. Il y a mise en jeu de signalisation, de réparation et le cycle cellulaire est arrêté. Les conséquences varient de la réparation effective des dommages à l'apoptose et peuvent aboutir à des phénotypes favorisant la genèse ou la progression de cancers.

#### b. Conséquences des dommages à l'ADN

En fonction de l'intensité des dommages, des cellules cibles et de l'efficacité des mécanismes de réparation, les conséquences peuvent être différentes. Ainsi, les dommages peuvent être totalement réparés, mais à forte dose infectieuse, si les dommages à l'ADN sont massifs, l'apoptose ou la sénescence (marquée par un phénotype de mégaloctose, élargissement des cellules) sera déclenchée chez les cellules (Secher et al. 2013) (Figure 23).

Cette sénescence est liée en partie à une cascade de signalisation aboutissant à la modification de la protéine p53 par SUMOylation (accumulation de formes ubiquitinylées), un élément clé dans le déclenchement de ce processus (Dalmaso et al. 2014). Les cellules touchées par la sénescence induite par la colibactine présentent un phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP). Elles produisent entre autres des médiateurs pro-inflammatoires et des espèces réactives de l'oxygène...

qui peuvent eux-même induire sénescence et dommages à l'ADN chez les cellules en contact (*bystander effect*) (Secher et al. 2013). Cette sécrétion pourrait favoriser la croissance de cellules non-infectées de manière paracrine (Secher et al. 2013).

A plus faible dose, on observera un arrêt transitoire du cycle cellulaire (Cuevas-Ramos et al. 2010). Les dommages à l'ADN peuvent alors être réparés avant la reprise du cycle cellulaire. Cependant, il peut persister des dommages résiduels chez certaines cellules qui vont continuer leur prolifération. Ainsi, il a d'abord été observé des anomalies chromosomiques persistantes (ponts durant l'anaphase, micronoyaux...) (Cuevas-Ramos et al. 2010). Dans cette expérience sur lignées cellulaires, l'exposition à la colibactine induit un phénotype proche de la transformation caractérisé par une croissance indépendante de l'ancrage (Cuevas-Ramos et al. 2010). Ces capacités de transformation secondaires aux aberrations chromosomiques sont également retrouvées suite à l'exposition d'organoïdes formés à partir de cellules primaires intestinales (Iftekhar et al. 2021).

L'instabilité chromosomique peut engendrer une augmentation de la fréquence de mutations géniques (Cuevas-Ramos et al. 2010) mais ces dernières peuvent être liées à une action directe de la colibactine. Ainsi des cassures double-brins aux séquences AAWWTT avec lesquelles la colibactine interagit préférentiellement ont été détectées après une courte infection de 3h (Dziubańska-Kusibab et al. 2020). Ces motifs correspondent à la signature mutationnelle spécifique de la colibactine identifiée après infection chronique d'organoïdes intestinaux par une autre équipe en parallèle (substitutions T>N survenant en ATA, ATT, TTT et délétions T survenant au niveau de polymères de T) (Pleguezuelos-Manzano et al. 2020). Ces données concordantes suggèrent un lien direct entre interaction ADN-colibactine et apparition de mutations.

### *c. Lien colibactine et cancer*

#### Un lien épidémiologique

L'impact des *E. coli pks+* dans le cancer a jusqu'à aujourd'hui été essentiellement étudié au niveau digestif dans le cancer colorectal, le microbiote intestinal en étant le principal réservoir sur le long terme. Différentes études montrent une plus grande prévalence de *E. coli pks+* chez les patients atteints de cancer colorectal que chez des contrôles (Arthur et al. 2012; Buc et al. 2013; Prorok-Hamon et al. 2014). Une PCR ciblant *clbA* dans les selles de ces patients est également plus fréquemment positive (Eklöf et al. 2017). Une méta-analyse regroupant huit études de métagénomique confirme la plus grande abondance de gènes *pks* au sein de prélèvements de selles de patients atteints de cancer colorectal (Wirbel et al. 2019). De manière intéressante, plus de patients atteints de polypose adénomateuse familiale (lésions d'origine génétique et qui prédisposent

fortement au cancer colorectal) hébergent au sein du biofilm en contact avec leurs lésions précancéreuses des *E. coli pks+* que des patients sains (Dejea et al. 2018). Il existe donc une association épidémiologique entre *E. coli pks* et cancer colorectal mais potentiellement également avant que ne se développe le cancer.

#### Des évidences expérimentales

*In vivo*, l'induction d'une réponse à des dommages à l'ADN liée à l'exposition à des *E. coli* produisant la colibactine a été notée dans plusieurs études (Cuevas-Ramos et al. 2010; Arthur et al. 2012; Cougnoux et al. 2014). Dans différents modèles murins, la colonisation par des *E. coli pks+* est associée à une augmentation du nombre de tumeurs. Les premières études se sont basées sur des modèles de colite associée au cancer (administration d'un cancérigène, l'azoxyméthane (AOM) chez des souris *Il10<sup>-/-</sup>* ou avec du sodium de sulfate-dextran (DSS)) (Arthur et al. 2012; Dalmaso et al. 2014; Cougnoux et al. 2014) puis une équipe a également démontré l'augmentation des tumeurs un modèle avec administration d'AOM et co-administration de *E. coli pks+* et de *Bacteroides fragilis* enterotoxinogène, également procarcinogène (Dejea et al. 2018). Dans ces différents modèles, on retrouve une place importante de l'inflammation, qu'elle soit génétique, chimiquement induite ou liée à la co-administration de *B. fragilis*. Ce paramètre semble même indispensable à l'observation d'un effet pro-carcinogène lié à l'administration de *E. coli pks+* en modèle murin (Arthur et al. 2014). L'expression de la colibactine pourrait être directement modulée par l'inflammation, puisque des données de transcriptomique suggèrent une induction de gènes *clb* dans ses conditions (Arthur et al. 2014). Un des chaînons manquants pour expliquer ce lien pourrait être l'oxygène, augmenté en condition d'inflammation digestive. La respiration aérobie permet à *E. coli* d'utiliser l'oxygène et semble nécessaire pour induire une prolifération et ainsi les effets procarcinogènes lié à la colibactine (Cevallos et al. 2019). Par ailleurs, l'utilisation d'anti-inflammatoire comme un anti-TNFalpha prévient la formation de tumeur dépendant de l'administration de *E. coli pks+* (Yang et al. 2020). Dans cette dernière étude le microbiote joue un rôle prépondérant puisque ce serait sa modification par le traitement anti-inflammatoire qui induirait l'effet protecteur (Yang et al. 2020). Cependant l'effet pro-tumoral lié à la colibactine est également retrouvé dans des souris initialement axéniques puis colonisées uniquement par une souche *E. coli pks+* dans un contexte génétique pro-tumoral et pro-inflammatoire (souris *APC<sup>Min/+</sup>; Il10<sup>-/-</sup>*), sans que la production de la génotoxine ne génère en elle-même de l'inflammation (Tomkovich et al. 2017).

#### Une des causes du cancer colorectal ?

Comme nous l'avons vu, les dommages induits sur des cellules, y compris des cellules intestinales d'animaux infectés, peuvent engendrer une instabilité chromosomique persistante et des mutations géniques qui pourraient favoriser l'apparition de lésions cancéreuses (Cuevas-Ramos et al. 2010). Des patterns de régions cibles de la colibactine et de mutations spécifiques ont également été mise en évidence *in vitro* sur cellules et organoïdes (Pleguezuelos-Manzano et al. 2020; Dziubańska-Kusibab et al. 2020). De manière intéressante, les signatures correspondant à ces mutations ou à des mutations dans ces régions sont également présentes dans des banques de métastases et tumeurs séquencées où elles sont retrouvées de manière prédominante dans les cancers colorectaux (environ 5 à 10 % des cas) (Pleguezuelos-Manzano et al. 2020; Dziubańska-Kusibab et al. 2020). En regardant de plus près les mutations survenant dans des gènes *driver* de cancer, les auteurs ont noté la présence de ces signatures, qui correspondent par exemple à plus de 5% des mutations dans le gène *APC* le plus fréquemment muté dans le cancer colorectal (Pleguezuelos-Manzano et al. 2020; Dziubańska-Kusibab et al. 2020). La survenue de telles mutations dans le gène *APC* pourrait également expliquer certains cas de polypose non familiale survenant *de novo* (Terlouw et al. 2020). Notons par ailleurs que cette signature mutationnelle est également retrouvée, certes plus rarement, dans d'autres types de cancers tels que des cancers ORL ou des voies urinaires (Pleguezuelos-Manzano et al. 2020).

Deux signatures mutationnelles associées et similaires à celles induites par la colibactine (SBSA et IDSA) avaient préalablement été décrites dans des biopsies colorectales d'individus sains (Lee-Six et al. 2019). En analysant individuellement le profil des mutations de différentes cryptes (contenant les cellules souches intestinales dont vont dériver les cellules qui se renouvellent), la survenue des signatures mutationnelles a pu être estimée comme survenant tôt dans l'enfance, avant 10 ans (Lee-Six et al. 2019). La colibactine pourrait donc imprimer des dommages à l'ADN qui seraient retrouvés chez des individus sains, dès l'enfance, bien avant la survenue de cancer mais qui pourraient constituer un facteur de risque de cancer colorectal. De même, expérimentalement, une colonisation de souriceaux dès la naissance par des *E. coli* produisant la colibactine induit des dommages à l'ADN des cellules épithéliales et à l'âge adulte une instabilité chromosomique persiste ; associée à une apoptose et une prolifération cellulaire plus élevées (Payros et al. 2014).

#### Un rôle dans la promotion et progression du cancer ?

La colibactine pourrait jouer un rôle procarcinogène en favorisant la progression du cancer. En effet comme nous l'avons vu, les cellules exposées à la colibactine peuvent modifier leur environnement par le SASP, et pourraient favoriser ainsi la prolifération de cellules tumorales et de tumeurs (Secher

et al. 2013; Dalmaso et al. 2014; Cougnoux et al. 2014). Des marqueurs de SASP sont retrouvés en modèle murin de colite associée au cancer de manière plus importante chez des souris colonisées avec des *E. coli pks+* que le mutant isogénique non producteur de colibactine. En particulier il y a induction de la production du facteur de croissance hépatocellulaire (HGF). De manière intéressante cette dérégulation de la sénescence est également retrouvée dans des biopsies de patients atteints de cancer colorectal colonisés par une souche *pks+* (Dalmaso et al. 2014; Cougnoux et al. 2014).

La colibactine pourrait également impacter la réponse au cancer, notamment la réponse immunitaire. Ainsi les patients colonisés par des *E. coli* produisant la colibactine présentent moins de lymphocytes T au niveau des biopsies de cancer colorectal (Lopès et al. 2020). Cet effet anti-lymphocytes T (CD3 et CD8 cytotoxiques) de mécanisme mal compris est confirmé en modèle murin de cancer, alors que ce sont des acteurs clés de l'immunité anti-tumorale (Lopès et al. 2020).

La présence de l'îlot *pks* modifierait également la réponse cellulaire en induisant l'expression de protéines impliquées dans le processus de l'autophagie (Lucas et al. 2020). L'autophagie jouerait elle-même un rôle protecteur vis-à-vis des effets de la colibactine puisqu'elle semble nécessaire pour que les cellules luttent contre l'effet pro-tumoral induit par la colibactine, en favorisant en particulier la réparation de l'ADN par le recrutement de la protéine RAD51, la prévention de la sénescence et de la prolifération cellulaire (Lucas et al. 2020). Chez des souris déficientes en autophagie dans les cellules intestinales, l'effet pro-carcinogène dépendant de la production de la génotoxine est augmenté, en parallèle de dommages à l'ADN, d'une inflammation et d'une prolifération cellulaire accrues (Lucas et al. 2020; Salesse et al. 2021)

En conclusion, rappelons que le cancer colorectal est avant tout multifactoriel (alimentation, environnement, génétique...). Le rôle exact de la colibactine dans le cancer colorectal doit encore être démontré et si il y a un impact il est très probable qu'elle agisse en synergie avec d'autres acteurs (inflammation, microbiote, autres toxines bactériennes par exemple de *Bacteroides fragilis*, mycotoxines présentes dans l'alimentation comme le déoxynivalénol... (Payros et al. 2017; Dejea et al. 2018; Yang et al. 2020)). Par ailleurs des *E. coli pks+* peuvent également coloniser sur des durées plus ou moins longues d'autres organes, en particulier la sphère urinaire lors de bactériuries asymptomatiques pouvant persister plusieurs mois voire années, y compris dès l'enfance. Pourtant, aucune étude à ce jour n'a porté sur l'étude des conséquences à court ou plus long terme de la colibactine dans ce cadre.

## 2) L'îlot *pks* : un facteur de virulence ?

Notons tout d'abord que l'îlot *pks* est fréquemment associé à d'autres facteurs de virulence impliqués dans les infections extra-intestinales, étant présent chez des souches du groupe B2 qui comporte de nombreux ExPEC. Epidémiologiquement, l'îlot génomique *pks* est associée à un potentiel accru pour la bactérie de causer une bactériémie (Johnson et al. 2008b).

De plus, la présence de l'îlot *pks* est associée à la virulence des bactéries porteuses dans plusieurs modèles d'infections. Dans un modèle murin de sepsis à *E. coli*, la présence d'un îlot *pks* intact diminue le taux de survie (Marcq et al. 2014). Cet effet peut être lié entre autres à la colibactine qui induirait des dommages à l'ADN des lymphocytes, ce qui entrainerait leur apoptose et exacerberait la lymphopénie T lors du sepsis (Marcq et al. 2014). Le tropisme méningé et la virulence dans un modèle de méningite à *Klebsiella pneumoniae* sont également liés à l'îlot *pks*, qui faciliterait la survie dans la circulation sanguine (Lu et al. 2017). De plus, la capacité à induire une infection systémique à partir de l'intestin est augmentée par la présence d'un îlot *pks* intact, en parallèle d'une colonisation digestive plus importante au niveau de la muqueuse (Lu et al. 2017).

Seul un mutant *clbA* a été testé dans ces deux études, or l'enzyme ClbA est pléiotrope et peut être impliquée dans la synthèse de sidérophores qui peuvent permettre de favoriser la croissance bactérienne (Martin et al. 2013). Bien que dans un modèle de sepsis, l'inactivation des deux PPTases EntD et ClbA pouvant servir à la synthèse des sidérophores soit nécessaire pour abolir totalement la virulence de *E. coli* (Martin et al. 2013), toute la perte de la virulence chez un mutant *clbA* ne peut être attribuée qu'en partie à la colibactine.

Une autre étude a porté sur la virulence de mutants *clbA* et *clbP* dans un modèle d'infection néonatale à *E. coli* (McCarthy et al. 2015). La virulence est également atténuée chez le mutant *clbP*. En revanche, elle est plus impactée chez le mutant *clbA* que chez le mutant *clbP*, bien que ClbP soit également pléiotrope et impliqué dans la maturation/export des sidérophores microcines. Comme dans le modèle récapitulant la méningite à *K. pneumoniae*, ce modèle d'infection néonatale chez le rat survient après une administration orale de bactéries. La première étape cruciale de l'infection réside dans l'établissement d'une colonisation intestinale, là encore impactée par les mutations *clbA* et *clbP* (McCarthy et al. 2015). A la lumière de ces données, il me semble important de soulever l'étroit lien entre l'impact sur la virulence des ExPEC et leurs capacités de colonisation intestinale qui va mécaniquement jouer sur l'importance du réservoir de ces derniers.

## Résultats expérimentaux

## Place du projet parmi mes différents travaux

Durant mon master 2 puis ma thèse de sciences au sein de l'équipe « Pathogénie et Commensalisme des entérobactéries », j'ai eu la chance de pouvoir travailler sur différentes thématiques et prendre part à différents projets. Naturellement, suivant l'intérêt de l'équipe pour la toxine qu'elle a découverte en 2006, la plupart de mes travaux et de ceux auxquels j'ai contribué ont porté sur l'îlot *pks*, que ce soit concernant sa régulation, son évolution, ou encore la diversité des métabolites produits grâce à l'îlot. Certains de ces travaux sont toujours en cours et d'autres ont d'ores et déjà fait l'objet de publications (Liste en Annexe). Cependant, la thématique centrale et autour de laquelle j'ai choisi d'articuler la présentation de cette thèse concerne l'angle original des infections urinaires pour lesquelles jusque-là l'épidémiologie et le rôle de l'îlot *pks* n'avait pas été étudié, bien qu'elles soient des infections très fréquentes et liées à *E. coli*. Ces questions ont donné lieu à deux projets et deux articles publiés qui sont présentés en suivant. A cette occasion, une large collection d'UPEC a été constituée et séquencée. Cette masse de données générées est en cours d'investigation et me permet également d'aborder à travers elle de nouveaux aspects : description et implication de nouveaux facteurs de virulence chez les UPEC, résistome et antibiorésistance, facteurs de dissémination de la résistance...

## Objectifs du travail expérimental présenté

Loin devant les sepsis et les méningites néonatales, les infections extra-intestinales les plus fréquemment causées par *E. coli* sont ainsi les infections urinaires. Or le lien entre îlot *pks*/colibactine et virulence n'a été que peu étudié dans le cadre de ce type d'infection. Des données épidémiologiques font bien état de la présence de l'îlot *pks* chez les UPEC, que ce soit dans le cadre d'infections symptomatiques ou asymptomatiques (Zdziarski et al. 2008; Krieger et al. 2011; Salvador et al. 2012; Capett et al. 2016; Micenková et al. 2017). En revanche peu de données corrélient sévérité de l'infection urinaire et présence de l'îlot *pks*, hormis une étude qui retrouve la même prévalence au niveau fécal chez des individus sains que dans des isolats d'urosepsis (Dubois et al. 2010). De même, expérimentalement, le rôle de l'îlot *pks* dans la physiopathologie des infections urinaires reste peu exploré. Une seule donnée de co-administration d'un mutant  $\Delta clbJ$  avec la souche CFT073wt (wild-type) dans un modèle murin ne retrouve pas de diminution significative de la charge bactérienne, voire même davantage de bactéries au niveau des reins 16h après infection par le mutant (Shea et al. 2020). Les conséquences sur l'hôte de la présence de l'îlot *pks* voire de la production de la génotoxine colibactine n'ont pas été abordées.

Ce travail a eu pour objectifs d'une part de mieux décrire l'épidémiologie de l'îlot *pks* dans les infections urinaires notamment en termes de lien avec la sévérité de l'infection et avec les autres îlots de pathogénicité avec lesquels l'îlot a des interactions fonctionnelles. D'autre part nous avons également cherché à comprendre le rôle et les conséquences de l'îlot *pks* sur l'hôte grâce à des expérimentations en modèle murin mais également sur une collection d'urines humaines. Ce projet a été valorisé sous la forme de deux articles présentés ci-après.

## Article 1 : The synergistic triad between microcin, colibactin, and salmochelin gene clusters in uropathogenic *Escherichia coli*

Massip, Clémence\*, Camille V. Chagneau\*, Michèle Boury, and Eric Oswald. 2020. *Microbes and Infection* 22 (3): 144–47. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.01.001>.

\* contribution équivalente

Dans ce premier article, nous avons réalisé une étude épidémiologique sur une large cohorte pour analyser la prévalence de l'îlot *pks* chez les souches issues d'infections urinaires. Nous nous sommes intéressés plus précisément à son association avec l'îlot microcine « tronqué » et le locus *iro* avec lesquels il présente une synergie fonctionnelle pour synthétiser des sidérophores-microcines à activité antimicrobienne (Massip et al. 2019).

Pour ce faire, nous avons constitué une collection de 225 souches de *E. coli* provenant de 223 patients ayant eu un ECBU positif aux urgences du CHU de Toulouse entre juillet et octobre 2017 et ainsi assimilables à des infections urinaires communautaires. Nous avons déterminé le phylogroupe et recherché la présence de différents facteurs de virulence par des PCR multiplex spécifiques. Cette collection présente une répartition cohérente avec l'épidémiologie classique des UPEC, tant sur le plan des facteurs de virulence que de l'antibiorésistance. Concernant l'îlot *pks*, nous retrouvons une prévalence de plus de 40% des souches positives dans la collection, avec une tendance à une plus forte présence chez les souches de bactériuries asymptomatiques que de pyélonéphrites. Chez les souches possédant l'îlot microcine tronqué, l'association est quasi systématique avec l'îlot *pks* et le locus *iro*, ce qui montre la conservation et sélection de cette triade synergique chez les UPEC. Plus qu'un facteur de virulence, l'îlot *pks* via son interconnexion avec d'autres îlots de pathogénicité pourrait constituer un facteur de colonisation, notamment du réservoir digestif.



Contents lists available at ScienceDirect

Microbes and Infection

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/micinf](http://www.elsevier.com/locate/micinf)

Short communication

## The synergistic triad between microcin, colibactin, and salmochelin gene clusters in uropathogenic *Escherichia coli*

Clémence Massip<sup>a, b, 1</sup>, Camille V. Chagneau<sup>a, 1</sup>, Michèle Boury<sup>a</sup>, Eric Oswald<sup>a, b, \*</sup><sup>a</sup> IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRA, ENVT, UPS, Toulouse, France<sup>b</sup> CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service de Bactériologie-Hygiène, Toulouse, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 30 October 2019

Accepted 6 January 2020

Available online 16 January 2020

## Keywords:

Uropathogenic *E. coli*

Microcin

Colibactin

Salmochelin

Urinary tract infections

## ABSTRACT

A functional synergy was previously demonstrated between microcin, salmochelin and colibactin islands in *Escherichia coli* strains from B2 phylogroup. We aimed to determine this association prevalence in uropathogenic *E. coli*, and whether it was predictive of the infection severity in a collection of 225 *E. coli* strains from urinary samples. The high prevalence of this triad, even if it wasn't correlated with infection severity, suggested that it might not be a virulence factor *per se* within the urinary tract, but would promote its colonization. This triad would enable the strain to dominate the rectal reservoir with a minimal genetic cost.

© 2020 The Author(s). Published by Elsevier Masson SAS on behalf of Institut Pasteur. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

*Escherichia coli* is the most common cause of urinary tract infections (UTI). These disorders are differentiated into pyelonephritis, cystitis, and asymptomatic bacteriuria [1]. Two hypotheses have long been opposed to explain the pathophysiology of UTI. In the prevalence hypothesis, the strain that causes UTI is simply the most abundant strain in the faecal *E. coli* population. In the special pathogenicity hypothesis, the causative strain represents a highly selected subset of the faecal *E. coli* population with enhanced virulence potential [2].

Uropathogenic *E. coli* (UPEC) mainly belong to phylogroup B2, and to a lesser extent phylogroups D, and F [3,4]. B2 phylogroup strains contain more virulence factors and pathogenicity islands than strains from other phylogroups [5]. In particular, they often synthesise microcins H47 and M. Bacteria producing such antimicrobial peptides display a bactericidal activity against phylogenetically related bacteria, which gives them a selective advantage in the intestinal niche [6]. Microcins H47 and M are modified post-translationally by the linkage of a catechol siderophore. They can thus enter and kill the sensitive bacterium thanks to a “Trojan Horse” stratagem, by mimicking the iron–siderophore complexes [7]. Among sequenced strains of *E. coli*, we recently demonstrated that B2 phylogroup strains carry a truncated microcin gene cluster,

deprived of two genes *mcmL* and *mcmK* involved in posttranslational modifications. In such strains, microcins production requires the glucosyltransferase IroB from the *iroA* locus and the peptidase ClbP from the *pks* island. These latter enzymes are primarily involved in the synthesis of independent virulence factors, *i.e.* salmochelins and colibactin, respectively [8,9]. Strikingly, this synergic association between the *pks* island, the *iroA* locus and the truncated microcin gene cluster is found in UPEC (CFT073, ABU83972, UPEC 26-1), whereas faecal strains (strain 042, FORC 028, C227-11) harbour a “complete” microcin gene cluster comprising *mcmL* and *mcmK* [10].

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

### 1. Materials and methods

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

\* Corresponding author. CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service de Bactériologie-Hygiène, 330 avenue de Grande Bretagne, 31000, Toulouse, France.

E-mail address: [eric.oswald@inserm.fr](mailto:eric.oswald@inserm.fr) (E. Oswald).

<sup>1</sup> C. M. and C. V. C.: equivalent contribution.

<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.01.001>

1286-4579/© 2020 The Author(s). Published by Elsevier Masson SAS on behalf of Institut Pasteur. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

*E. coli* strains were classified into three groups according to the clinical diagnosis: 104 pyelonephritis, 84 cystitis, and 37 asymptomatic bacteriuria causing strains. Asymptomatic bacteriuria was defined as culture positive without UTI clinical symptoms. Patients having urological comorbidities had been excluded, as well as those catheterised or with diagnoses which could lead to misclassification (e.g. renal colic, epididymo-orchitis). As the diagnosis and stratification of UTIs are more complicated in the elderly [11], subjects aged over 75 were excluded.

All strains were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Microflex LT MALDI-TOF MS, Bruker Daltonik GmbH, Germany) and their antibiotic susceptibility profiles were determined (Vitek 2 system, bioMérieux, France) according to the criteria of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing ([www.eucast.org](http://www.eucast.org), 2017).

The phylogenetic group of each *E. coli* strain was determined using the extended quadruplex PCR protocol described previously [12]. Using two multiplex panels, the presence of three siderophore systems (salmochelins, aerobactin, and yersiniabactin), and four virulence factors was screened in all isolates: hemolysin  $\alpha$ , cytotoxic necrotizing factor 1 (*cnf1*), secreted auto transporter toxin (*sat*), and allele II of adhesin gene *papG*. Detection of the *pks* island was performed based on the search for the *clbN* and *clbB* genes. Genes *mchB* and *mcmA* encoding microcins H47 and M precursor proteins were searched for, as well as genes *mcmL/mchA* and *mcmK/mchS1* involved in their posttranslational modifications [13]. The PCR primers and conditions are described in the Supplementary data.

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

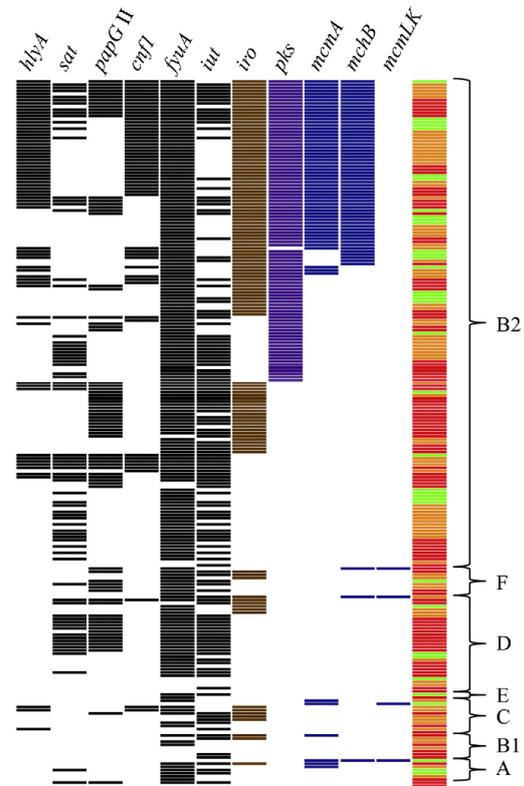
## 2. Results

*E. coli* strains mostly belonged to the B2 phylogroup (155/225, i.e. 69%) and to a far lesser extent to the D phylogroup (31/225, i.e. 14%). The other phylogroups accounted only for a few strains: 7 for phylogroup A, 8 for B1, 11 for C, 2 for E, and 9 for F (Fig. 1). There was no statistical difference in the percentages of B2 phylogroup strains between the asymptomatic bacteriuria, cystitis and pyelonephritis groups (Fig. 2).

Resistance to amoxicillin was observed in 104 (46%) isolates, to amoxicillin-clavulanic acid in 39 (17% with a breakpoint at 8 mg/L), to third generation cephalosporins in 12 (5%), to trimethoprim-sulfamethoxazole in 52 (23%), to quinolones in 33 (15%). All strains were susceptible to carbapenems, nitrofurantoin, and fosfomicin. There was no statistical difference in the prevalence of resistant strains among the different phylogroups, or depending on the clinical severity of urinary infections (data not shown).

Yersiniabactin was the most commonly detected siderophore in our study with 202/225 (90%) of positive strains (Fig. 2). Aerobactin and the allele II of *papG* were more prevalent in the pyelonephritis (71% and 52%, respectively) than in the cystitis group (50% and 18%, respectively). Conversely, *cnf1* was less found in strains responsible for pyelonephritis (16%) compared to cystitis causing strains (32%). As regards yersiniabactin, salmochelin, hemolysin  $\alpha$ , and *sat*, there was no significant difference in distribution according to clinical severity.

Apart from these classically described virulence factors in *E. coli* strains causing UTIs, we specially focused on the distribution of microcin, salmochelin, and colibactin islands. Genes encoding microcins H47 or M precursors were detected in 31% of strains (70/225). Strains carrying these microcins genes were significantly more numerous among B2 phylogroup strains than among non-B2 strains (62/155 vs 8/70; *P* = 0.00001) (Fig. 1). Out of the 63 strains



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

that harboured the microcin M gene, 55 strains (87%) also carried the microcin H47 precursor gene.

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

## 3. Discussion

We gathered 225 *E. coli* strains from community-acquired UTIs. The higher prevalence of strains from B2 phylogroup, followed by D phylogroup is in agreement with previous reports [3,11,14].

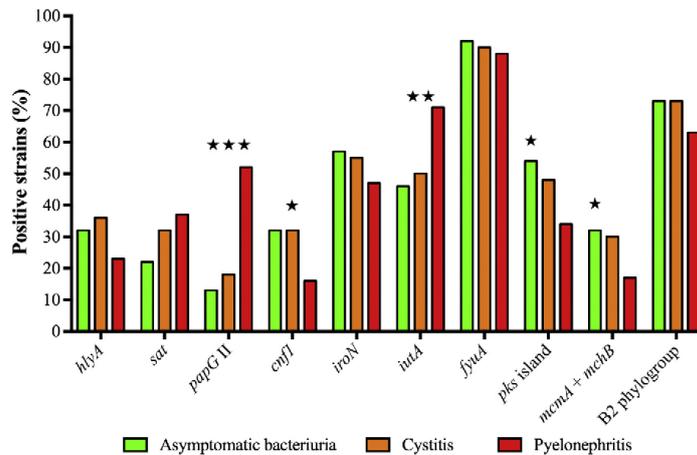


Fig. 2. Prevalence of virulence determinants according to clinical severity. The statistical differences between either the asymptomatic bacteriuria or the cystitis group and the pyelonephritis group is denoted \* for  $P$  values < 0.05, \*\* for  $P$  < 0.01, and \*\*\* for  $P$  < 0.001.

Antibiotic resistance figures are also similar to those reported in 2017 in France for *E. coli* strains responsible for community-acquired UTIs [15].

Iron concentration is particularly low in urine. Therefore, iron acquisition systems are important colonization factors for UPEC. The most commonly detected siderophore in our study was yersiniabactin (*fyuA*). Indeed, experimental data showed that yersiniabactin was a key virulence factor in strains responsible for pyelonephritis and cystitis. *FyuA* was even proposed as a vaccine target [16]. Aerobactin (*iutA*) was the only siderophore which prevalence differed according to clinical severity, with an over-representation among pyelonephritis-causing strains (71%). This higher prevalence of aerobactin in strains responsible for pyelonephritis compared with cystitis is in accordance with previous reports [17,18]. Watts *et al.* proved that enterobactin and aerobactin contributed most to total siderophore activity and growth in defined iron-deficient medium [19]. At pH 5.5, aerobactin plays an overwhelming role [19], which correlates with its higher production and the higher stability of  $Fe^{3+}$ -aerobactin in acidic environments [20].

As previously described there were more strains carrying allele II of *papG* in the pyelonephritis than in the cystitis group [3,14,18]. In a mouse model, this allele was shown to promote the early establishment of *E. coli* in the kidney [21]. Cytotoxic necrotizing factor 1 was associated to cystitis in our study, rather than pyelonephritis. Cytotoxic necrotizing factor 1 promotes bacterial internalisation and induces the host cell anti-apoptotic and pro-survival pathways, whereas hemolysin  $\alpha$  triggers epithelial cell lysis, which facilitates iron and nutrient acquisition by the bacteria [1]. Although, they are classically described as virulence factors in *E. coli* strains causing UTI, the lack of correlation we observed in our study between clinical severity and the presence or expression of the genes encoding these toxins had previously been reported [3,18].

Therefore, the characteristics of our collection of UPEC are in line with the literature in terms of distribution of antibiotic resistance, phylogroups, and virulence factors according to clinical severity [3,11,14,15,18].

The strong association we noticed between microcins H47 and M had previously been reported in smaller collections of UPEC

[4,22]. It suggests that, in UPEC, genes encoding microcins M and H47 are located on the same gene cluster, like in the model UPEC strains CFT073 and ABU83972 [23]. We proved in a recent study that in strains carrying a truncated microcin gene cluster (deprived of *mcmL* and *mcmK*), microcin production required ClbP encoded by the *pks* island and *iroB* from the *iroA* locus [10]. The mutual exclusion between the *iroA* locus and the *iroB/iroD* homologs *mcmL/mcmK* had previously been noticed in a study with a collection of 18 microcin-producing UPEC, but the *pks* island had not been searched for [22].

In our study, the *pks* island and genes encoding precursors of microcins H47 and M were more frequently found in ABU than in pyelonephritis-causing strains (Fig. 2). With a smaller collection of cystitis and pyelonephritis-causing strains, Abraham *et al.*, had observed no significant difference in the prevalence of genes encoding microcins H47 and M between ABU and symptomatic UTI strains [4]. Therefore, these microcins or the *pks* island do not appear as *bona fide* virulence factors within the urinary tract.

The high prevalence in UPEC of the association between a truncated microcin gene cluster, the *pks* island, and the *iroA* locus led to the hypothesis that this synergistic triad would be a selective advantage to colonize the urinary tract. Indeed, in a study that compared the whole genome sequences of UTI isolates to faecal isolates from the same patients, the microcin M precursor gene was significantly over-represented in UTI isolates [24]. The analyses did not identify any of the classical UPEC virulence factors (*e.g.* fimbriae) as significantly over-represented in UTI isolates [24]. Microcins would thus enable the carrying strain to dominate the rectal flora, which is the reservoir for the strain infecting the urinary tract [25].

Therefore, we hypothesize that the synergistic triad between the truncated microcin gene cluster, the *pks* island, and the *iroA* locus would promote urinary tract colonization. It enables the production of at least three colonization determinants (microcins, colibactin, and salmochelin) with a limited impact on genome size [10]. We observed that strains that harboured this triad carried significantly more virulence factors than other UPEC. Thus, the domination of the rectal niche, which is the reservoir for UTIs [25], with a minimal genetic cost might also favour the selection of other

virulence factors. Hence, the synergistic triad between a truncated microcin gene cluster, the *pks* island, and the *iroA* locus could be the element that reconciliates the prevalence and the special-pathogenicity hypotheses.

#### Funding

This work was supported by research grants ANR-16-CE18-0011 and ANR-17-CE35-0010 from the Agence Nationale de la Recherche.

#### Declaration of Competing Interest

The authors have no conflict of interest regarding this work.

#### Acknowledgements

The authors thank the technical staff of the bacteriology laboratory at Toulouse University Hospital for their help in collecting the *E. coli* strains.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.01.001>.

#### References

- [1] Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol* 2015;13:269–84.
- [2] Moreno E, Andreu A, Pigrau C, Kuskowski MA, Johnson JR, Prats G. Relationship between *Escherichia coli* strains causing acute cystitis in women and the fecal *E. coli* population of the host. *J Clin Microbiol* 2008;46:2529–34.
- [3] Johnson JR, Owens K, Gajewski A, Kuskowski MA. Bacterial characteristics in relation to clinical source of *Escherichia coli* isolates from women with acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women. *J Clin Microbiol* 2005;43:6064–72.
- [4] Abraham S, Chapman TA, Zhang R, Chin J, Mabbett AN, Totsika M, et al. Molecular characterization of *Escherichia coli* strains that cause symptomatic and asymptomatic urinary tract infections. *J Clin Microbiol* 2012;50:1027.
- [5] Tourret J, Denamur E. Population phylogenomics of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 2016;4.
- [6] Duquesne S, Destoumieux-Garçon D, Peduzzi J, Rebuffat S. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat Prod Rep* 2007;24:708–34.
- [7] Vassiliadis G, Destoumieux-Garçon D, Lombard C, Rebuffat S, Peduzzi J. Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M and H47. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:288–97.
- [8] Fischbach MA, Lin H, Liu DR, Walsh CT. *In vitro* characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:571.
- [9] Dubois D, Baron O, Cougnoux A, Delmas J, Pradel N, Boury M, et al. ClbP is a prototype of a peptidase subgroup involved in biosynthesis of nonribosomal peptides. *J Biol Chem* 2011;286:35562–70.
- [10] Massip C, Branchu P, Bossuet-Greif N, Chagneau CV, Gaillard D, Martin P, et al. Deciphering the interplay between the genotoxic and probiotic activities of *Escherichia coli* Nissle 1917. *PLoS Pathog* 2019;15:e1008029.
- [11] Amarsy R, Guéret D, Benmansour H, Flicoteaux R, Berçot B, Meunier F, et al. Determination of *Escherichia coli* phylogroups in elderly patients with urinary tract infection or asymptomatic bacteriuria. *Clin Microbiol Infect* 2019;25:839–44.
- [12] Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 2013;5:58–65.
- [13] Vassiliadis G, Peduzzi J, Zirah S, Thomas X, Rebuffat S, Destoumieux-Garçon D. Insight into siderophore-carrying peptide biosynthesis: enterobactin is a precursor for microcin E492 posttranslational modification. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3546–53.
- [14] Johnson JR, Kuskowski MA, Gajewski A, Soto S, Horcajada JP, Anta D, et al. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J Infect Dis* 2005;191:46–50.
- [15] French National Observatory for Epidemiology of Bacterial Resistance to Antimicrobials (ONERBA). Annual Report. 2017. <http://onerba.org/publications/rapports-onerba/>. [Accessed 26 February 2019].
- [16] Brumbaugh AR, Smith SN, Subashchandrabose S, Himpls SD, Hazen TH, Rasko DA, et al. Blocking yersiniabactin import attenuates extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in cystitis and pyelonephritis and represents a novel target to prevent urinary tract infection. *Infect Immun* 2015;83:1443–50.
- [17] Ruiz J, Simon K, Horcajada JP, Velasco M, Barranco M, Roig G, et al. Differences in virulence factors among clinical isolates of *Escherichia coli* causing cystitis and pyelonephritis in women and prostatitis in men. *J Clin Microbiol* 2002;40:4445–9.
- [18] Mobley HLT. Measuring *Escherichia coli* gene expression during human urinary tract infections. *Pathogens* 2016;5.
- [19] Watts RE, Totsika M, Challinor VL, Mabbett AN, Ulett GC, Voss JJD, et al. Contribution of siderophore systems to growth and urinary tract colonization of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2012;80:333.
- [20] Valdebenito M, Crumbliss AL, Winkelmann G, Hantke K. Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin, and yersiniabactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Int J Med Microbiol* 2006;296:513–20.
- [21] Tseng CC, Huang JJ, Wang MC, Wu AB, Ko WC, Chen WC, et al. PapG II adhesin in the establishment and persistence of *Escherichia coli* infection in mouse kidneys. *Kidney Int* 2007;71:764–70.
- [22] Azpiroz MF, Poey ME, Laviña M. Microcins and urovirulence in *Escherichia coli*. *Microb Pathog* 2009;47:274–80.
- [23] Azpiroz MF, Bascuas T, Laviña M. Microcin H47 system: an *Escherichia coli* small genomic island with novel features. *PLoS One* 2011;6:e26179.
- [24] Nielsen KL, Stegger M, Kiil K, Godfrey PA, Feldgarden M, Lilje B, et al. Whole-genome comparison of urinary pathogenic *Escherichia coli* and faecal isolates of UTI patients and healthy controls. *Int J Med Microbiol* 2017;307:497–507.
- [25] Yamamoto S, Tsukamoto T, Terai A, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Genetic evidence supporting the fecal-perineal-urethral hypothesis in cystitis caused by *Escherichia coli*. *J Urol* 1997;157:1127–9.

## Supplementary data

1

2

3 The phylogenetic groups were determined using the extended quadruplex PCR protocol  
4 previously described [1]. Virulence factors were searched for using multiplex panels.

5

6 Table 1: Primer sequences and pool designations for virulence factors detection

Primer pool	Target gene	Primer sequence (forward; reverse)	Size (bp)	Source
1	<i>iutA</i>	GGCTGGACATCATGGGAAGCTGG; CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	302	[2]
	<i>iroN</i>	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG; GACGCCGACATTAAGACGCAG	667	
	<i>fyuA</i>	TGATTAACCCCGCGACGGGAA; CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	787	
	<i>cnfI</i>	ATCTTATACTGGATGGGATCATCTTGG; GCAGAACGACGTTCTTCATAAGTATC	974	
2	<i>papG</i> allele II	GGGATGAGCGGGCCTTTGAT; CGGGCCCCCAAGTAACTCG	190	[2]
	<i>sat</i>	GCAGCTACCGCAATAGGAGGT; CATTTCAGAGTACCGGGGCCTA	937	[2]
	<i>hlyA</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT; ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	1177	[3]
3	<i>clbB</i>	GATTTGGATACTGGCGATAACCG; CCATTTCCCGTTTGAGCACAC	579	[4]
	<i>clbN</i>	GTTTTGCTCGCCAGATAGTCATTC; CAGTTCGGGTATGTGTGGAAGG	733	[4]
4	<i>mcmA</i>	CGTTTATTAGCCCGGGATTT; GCAGACGAAGAGGCACTTG	166	[5]
	<i>mchI/mchB</i>	CACTTTCATCCCTTCGGATTG; AGCTGAAGTCGCTGGCGCACCTCC	227	[6]
5	<i>mcmL/mcmK</i>	GTCCTGCAGAGATCGCAGAG; CCAGACTCCCGAAGATATTTG	1452	This study

7

8

9 Table 2: Thermal cycler program (pools 1-4) with Qiagen Multiplex PCR Kit

	Pools 1-2	Pool 3-5	Pool 4
Activation	95°C for 3 min	95°C for 3 min	95°C for 3 min
30 cycles of:			
Denaturation	94°C for 60 s	94°C for 60 s	94°C for 60 s
Annealing	63°C for 30 s	55°C for 90 s	59°C for 30 s
Extension	72°C for 90 s	72°C for 60 s	72°C for 30 s
Final extension	72°C for 30 s	60°C for 10 s	72°C for 30 s

10

11

12

13 [1] Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli*

14 phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-

15 groups. *Environ Microbiol Rep* 2013;5:58–65. doi:10.1111/1758-2229.12019.

16 [2] Johnson JR, Porter S, Johnston B, Kuskowski MA, Spurbeck RR, Mobley HLT, et al.

17 Host characteristics and bacterial traits predict experimental virulence for *Escherichia coli*

18 bloodstream isolates from patients with urosepsis. *Open Forum Infect Dis* 2015;2.

19 doi:10.1093/ofid/ofv083.

20 [3] Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Detection of

21 urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS*

22 *Immunol Med Microbiol* 1995;12:85–90. doi:10.1111/j.1574-695X.1995.tb00179.x.

23 [4] Johnson JR, Johnston B, Kuskowski MA, Nougayrede J-P, Oswald E. Molecular

24 epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli pks* genomic island. *J*

25 *Clin Microbiol* 2008;46:3906–11. doi:10.1128/JCM.00949-08.

- 26 [5] Micenková L, Štaudová B, Bosák J, Mikalová L, Littnerová S, Vrba M, et al. Bacteriocin-  
27 encoding genes and ExPEC virulence determinants are associated in human fecal  
28 *Escherichia coli* strains. BMC Microbiol 2014;14:109. doi:10.1186/1471-2180-14-109.
- 29 [6] Gordon DM, O'Brien CL. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin  
30 production in *Escherichia coli*. Microbiology 2006;152:3239–44.  
31 doi:10.1099/mic.0.28690-0.

32

## Article 2 : Uropathogenic *E. coli* induces DNA damage in the bladder

Chagneau, Camille V., Clémence Massip, Nadège Bossuet-Greif, Christophe Fremez, Jean-Paul Motta, Ayaka Shima, Céline Besson, Pauline Le Faouder, Nicolas Cénac, Marie-Paule Roth, Hélène Coppin, Maxime Fontanié, Patricia Martin, Jean-Philippe Nougayrède, Eric Oswald. *PLOS Pathogens* 17, no. 2 (25 February 2021): e1009310. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009310>

Dans ce second article, nous nous intéressons plus précisément au rôle et aux conséquences de l'îlot *pks* et de la colibactine dans la physiopathologie des infections urinaires.

Premièrement nous repartons de la collection d'UPEC décrite dans l'article 1 et nous parachevons l'analyse des souches en réalisant leur séquençage complet par méthode Illumina. Cela a permis une analyse phylogénétique plus précise via la détermination des *sequences types* et de compléter l'analyse du virulome. Chez les UPEC *pks+*, la fonctionnalité de l'îlot pour la production de colibactine a été testée. Nous analysons également les urines des patients conservées en parallèle pour rechercher le métabolite C14-Asn issu de la maturation de la colibactine. Il apparaît *in fine* que l'îlot *pks* est fonctionnel chez les UPEC pour la production de colibactine et que, pour la première fois chez l'Homme, on retrouve un métabolite témoin de sa production durant l'infection urinaire.

L'utilisation d'un modèle murin d'infection urinaire permet en parallèle d'examiner les conséquences d'une infection par un UPEC *pks+*. Il s'avère que l'îlot est exprimé rapidement après le début de l'infection. Il est associé à la présence de dommages à l'ADN au sein des cellules urothéliales. Les cellules progénitrices de la vessie peuvent également être touchées, ce qui soulève des hypothèses quant à un rôle potentiel des infections urinaires à UPEC *pks+* dans le cancer de la vessie.

## RESEARCH ARTICLE

Uropathogenic *E. coli* induces DNA damage in the bladder

Camille V. Chagneau<sup>1</sup>\*, Clémence Massip<sup>1,2</sup>\*, Nadège Bossuet-Greif<sup>1</sup>, Christophe Fremez<sup>3</sup>, Jean-Paul Motta<sup>1</sup>, Ayaka Shima<sup>1</sup>, Céline Besson<sup>1</sup>, Pauline Le Faouder<sup>4</sup>, Nicolas Cénac<sup>1</sup>, Marie-Paule Roth<sup>1</sup>, Hélène Coppin<sup>1</sup>, Maxime Fontanié<sup>3</sup>, Patricia Martin<sup>1,3</sup>, Jean-Philippe Nougayrède<sup>1\*</sup>, Eric Oswald<sup>1,2\*</sup>

**1** IRSD, INSERM, Université de Toulouse, INRA, ENVT, UPS, Toulouse, France, **2** CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Service de Bactériologie-Hygiène, Toulouse, France, **3** VibioSphen, Prologue Biotech, Labège, France, **4** MetaToulLipidomics Facility, INSERM UMR1048, Toulouse, France

\* These authors contributed equally to this work.

\* [jean-philippe.nougayrede@inrae.fr](mailto:jean-philippe.nougayrede@inrae.fr) (JPN); [eric.oswald@inserm.fr](mailto:eric.oswald@inserm.fr) (EO)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Chagneau CV, Massip C, Bossuet-Greif N, Fremez C, Motta J-P, Shima A, et al. (2021) Uropathogenic *E. coli* induces DNA damage in the bladder. *PLoS Pathog* 17(2): e1009310. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009310>

**Editor:** Matthew A. Mulvey, University of Utah, UNITED STATES

**Received:** September 30, 2020

**Accepted:** January 13, 2021

**Published:** February 25, 2021

**Copyright:** © 2021 Chagneau et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. Sequencing data presented in the current manuscript have been deposited to the NCBI database, BioProject PRJNA615384 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA615384>). This project contains the raw reads data deposited in the Sequence Read Archive (SRA) and are publicly available. All other relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

## Abstract

Urinary tract infections (UTIs) are among the most common outpatient infections, with a lifetime incidence of around 60% in women. We analysed urine samples from 223 patients with community-acquired UTIs and report the presence of the cleavage product released during the synthesis of colibactin, a bacterial genotoxin, in 55 of the samples examined. Uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from these patients, as well as the archetypal *E. coli* strain UTI89, were found to produce colibactin. In a murine model of UTI, the machinery producing colibactin was expressed during the early hours of the infection, when intracellular bacterial communities form. We observed extensive DNA damage both in umbrella and bladder progenitor cells. To the best of our knowledge this is the first report of colibactin production in UTIs in humans and its genotoxicity in bladder cells.

## Author summary

Colibactin is a bacterial genotoxin suspected of being involved in cancer. So far, the focus has been on colorectal cancer following asymptomatic intestinal carriage of genotoxic *Escherichia coli*. Here, we show for the first time that this genotoxin is produced in humans, by detecting it in the urine of patients suffering from urinary tract infections. We subsequently show in a rodent UTI model the genotoxic activity of colibactin in the bladder, including in regenerative cells. These results raise the hypothesis of a role of UTI in bladder cancer, which could be an interesting perspective for future investigation.

## Introduction

Urinary tract infections (UTIs) are one of the most common bacterial infections, affecting approximately 150 million individuals each year [1]. UTIs occur most frequently in women, with more than 60% of females diagnosed with a UTI during their lifetime [2]. The severity of

**Funding:** This work was supported by grants from the French National Agency for Research (ANR; <https://anr.fr>) (UTI-TOUL ANR-17-CE35-0010 (EO) and LiBacPain ANR-18-CE14-0039 (NC)) and the French National Institute for Health and Medical Research (INSERM, <https://www.inserm.fr>) (two-years grant "poste d'accueil INSERM 2018" (CVC)). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

these infections ranges from asymptomatic bacteriuria and cystitis, *i.e.* infections localised to the bladder, to urosepsis, which can be fatal. Recurrences are very frequent, since approximately 30% of women experience a new UTI episode after resolution of the initial infection [2]. In addition to their consequences in terms of morbidity, mortality and associated economic and societal losses, UTIs are also a major reason for antibiotic treatments and thus strongly contribute to the global issue of antibiotic resistance. *Escherichia coli* strains, termed uropathogenic *E. coli* (UPEC) cause approximately 80% of all UTIs. These strains belong mainly to phylogroup B2 in western countries, which is increasingly present in the intestinal microbiota, the reservoir of UPEC [3,4]. UPEC strains produce a large number of virulence factors [5–7]. In particular, several toxins have long been associated with UPEC pathogenicity, such as  $\alpha$ -hemolysin and CNF1 toxins [8,9]. More recently, a large proportion of UPEC strains which carry *pks* pathogenicity island encoding the genotoxin colibactin have been described [10–13].

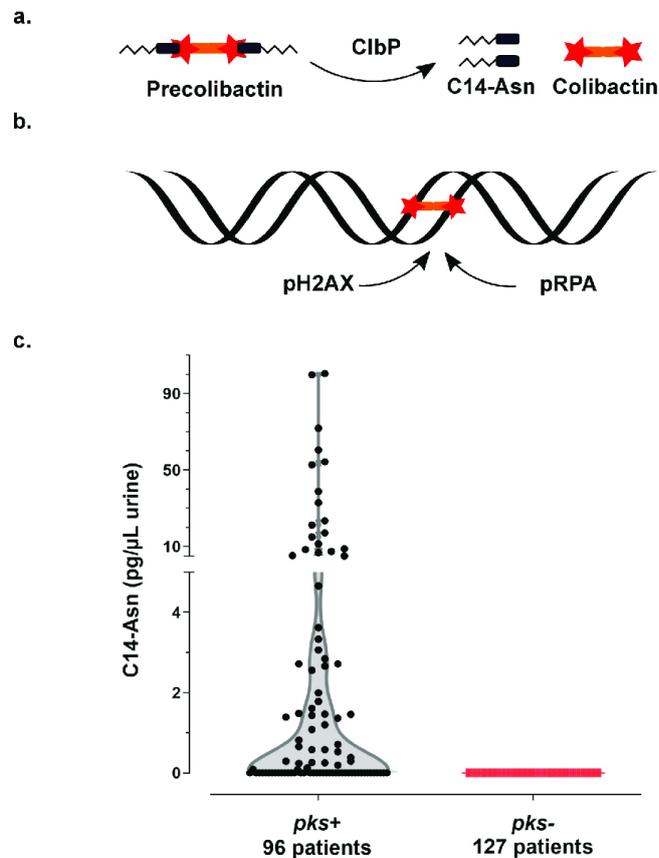
The *pks* pathogenicity island, composed of *clbA*-S genes, encodes a polyketide- non-ribosomal -peptide (PK-NRP) biosynthesis machinery [14]. Colibactin is first synthesised as an inactive prodrug by ClbN followed by the sequential interventions of multiple Clb enzymes. The ClbP peptidase subsequently cleaves the C14-Asparagine (C14-Asn) motif thereby releasing the mature, active form of colibactin with its twin warheads (Fig 1A) [15–17]. The genotoxin alkylates adenine residues on both strands of DNA, producing DNA interstrand cross-links [18–20]. These highly toxic DNA lesions initiate a DNA damage response, by phosphorylating replication protein A (pRPA) and phosphorylating the H2AX histone variant (pH2AX) (Fig 1B) [14,18]. Incomplete repair of this DNA damage can result in gene mutations [21]. *E. coli* strains carrying *pks* island have been shown to promote colon carcinogenesis in different mouse models [22–24]. In epidemiological studies, *pks+* *E. coli* strains are more prevalent in the gut microbiota of patients with colorectal cancer and a distinct mutational signature in human cancer genomes, predominantly colorectal tumours, was recently associated with colibactin genotoxic activity, further implicating an involvement of colibactin-producing *E. coli* in tumorigenesis [22,23,25,26]. This mutational signature has also been identified in tumours of the urinary tract [26].

Our current study shows that colibactin producing bacteria induce DNA damage in bladder cells, including in urothelial regenerative cells and that colibactin is produced by *pks+* UPEC clinical strains isolated from human UTIs.

## Results

### Evidence of colibactin production in the urine of patients infected with UPEC

We collected urine samples from 223 adult patients with community-acquired pyelonephritis, cystitis or asymptomatic bacteriuria caused by *E. coli* at the University Hospital of Toulouse, France. Urine samples were analysed for the presence of C14-Asn, the aminolipid released during the final colibactin maturation step (Fig 1A). In contrast to the highly reactive and unstable colibactin, C14-Asn is stable and can be quantified by LC-MS/MS. C14-Asn was detected in urine samples of one quarter (55/223) of UTI patients, including asymptomatic infections (Fig 1C and S1 Table). We isolated *E. coli* strains harbouring genomic *pks* island from all urine samples which also contained C14-Asn. Conversely, C14-Asn was below the LC-MS/MS detection limits in urine samples of patients infected with *E. coli* strains which did not carry the *pks* pathogenicity island.

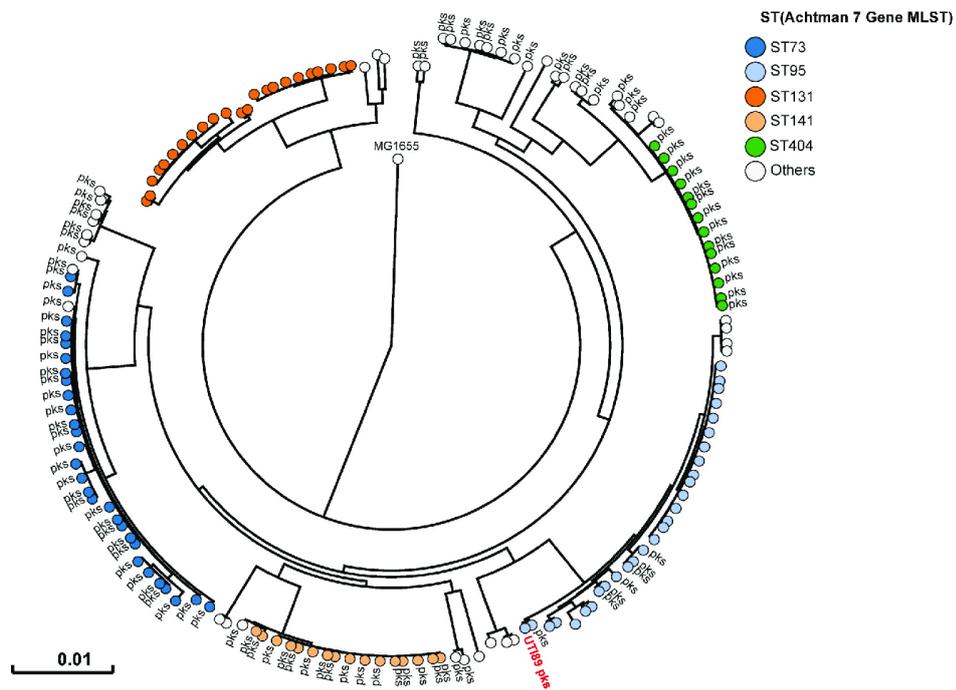


**Fig 1. Synthesis of the genotoxin, colibactin, releases the C14-Asn metabolite detected in the urine of patients with UTI.** a. Colibactin is first synthesised as a prodrug, precolibactin and then cleaved by ClbP peptidase thereby releasing the mature genotoxic dimeric colibactin, and C14-Asn. b. Colibactin alkylates both strands of the DNA helix, generating an interstrand cross-link. In response to this DNA damage, the host cell machinery recruits and phosphorylates the H2AX and RPA proteins. c. Concentration of C14-Asn in human urines according to the presence of a *pks* island in the genome of the corresponding UPEC isolate as determined by LC-MS/MS. All individual data points are shown on a violin plot, with a two segments linear Y range. C14-Asn was below the LC-MS/MS detection limit in the urine of patients infected with UPEC isolates that did not contain a *pks* island.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009310.g001>

### Phylogenetic distribution of *pks* island in UPEC strains

All 225 *E. coli* strains isolated during this sampling campaign were whole genome sequenced. The phylogenetic distribution of these *E. coli* isolates was typical of strains which cause UTIs [2]. A majority of strains belonged to the phylogroups B2 (69%) and D (15%) (Fig 2 and S1 Table). Forty three percent of strains harboured *pks* island. All the *pks*+ strains belonged to the phylogenetic group B2 and to the most common sequence types (STs) of extra-intestinal



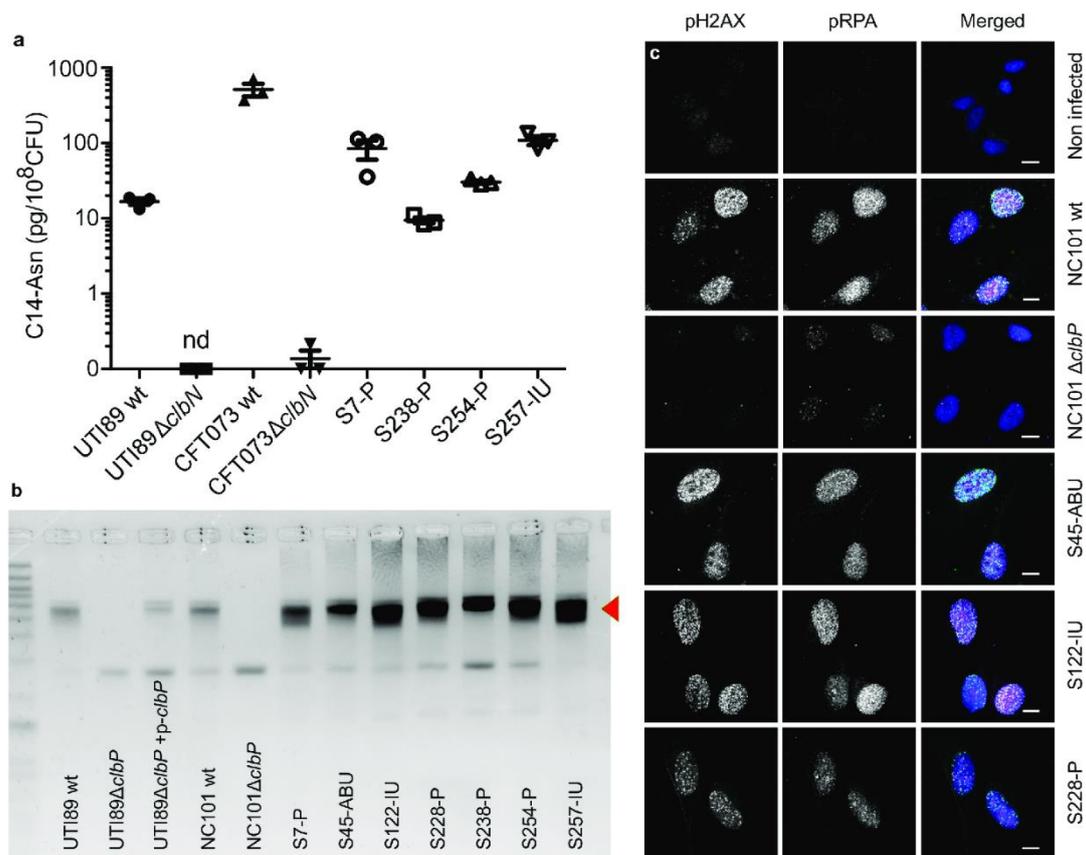
**Fig 2. Human *pks*+ UPEC belong to major lineages of extraintestinal pathogenic *E. coli* from phylogroup B2.** A phylogenetic tree based on whole genome analysis was constructed and rooted on *E. coli* MG1655. Each circle represents an individual UPEC strain. Main Sequence Types are grouped by colours. The presence of a *pks* island is denoted adjacent to each circle. The archetypal UPEC strain UT189, which is *pks*+, was also included in this tree.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009310.g002>

pathogenic *E. coli* such as ST73, ST95, ST141 and ST404 (Fig 2). As expected for extra-intestinal pathogenic *E. coli*, multiple known or suspected virulence genes were also present in the genome of these *pks*+ strains (S2 Table). *pks* island are thus widely present in the typical UPEC strains that cause community-acquired UTIs.

### UPEC strains carrying *pks* island produce the genotoxin colibactin

We next sought to confirm that *pks*+ UPEC strains expressed colibactin. We readily detected C14-Asn in *in vitro* cultures of both clinical UPEC isolates and the archetypal strains UT189 (cystitis collection strain, commonly used in rodent models of UTI) and CFT073 (pyelonephritis collection strain) (Fig 3A). Production of C14-Asn depended on a fully functional colibactin assembly line, as mutation of the ClbN synthase gene abrogated its detection (Fig 3A). As for the strain NC101, which has been shown to be pro-carcinogenic in colorectal cancer mouse models, we detected formation of interstrand DNA crosslink by UT189, but not by *clbP* mutants not able to mature colibactin anymore (Fig 3B). The same DNA crosslinking effect was observed with clinical *pks*+ UPEC isolates from asymptomatic bacteriuria, cystitis or pyelonephritis cases (Fig 3B). As was shown for NC101, infecting human epithelial cells with



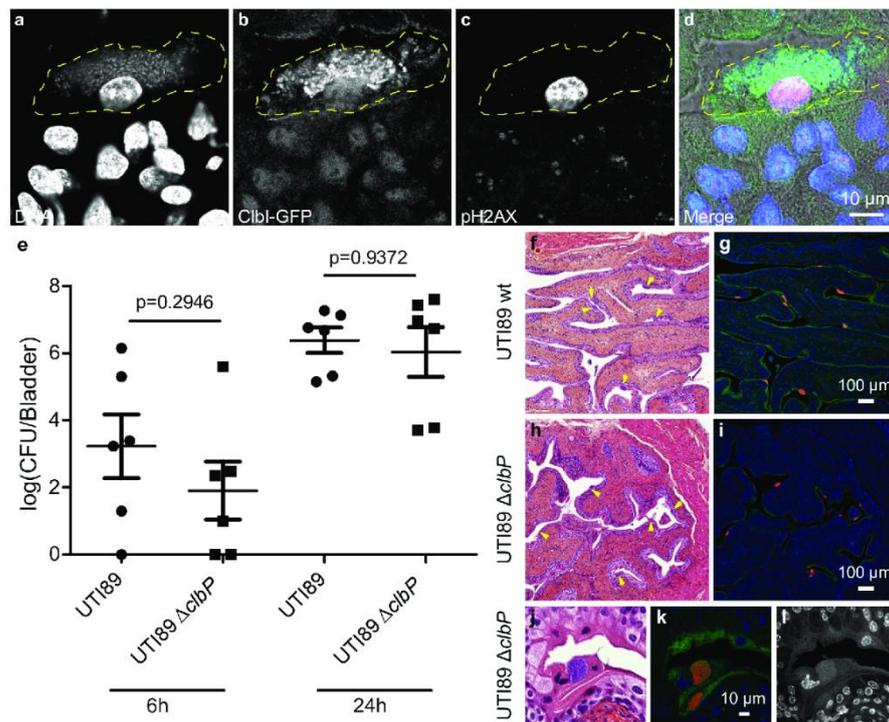
**Fig 3. The archetypal cystitis *E. coli* strain UTI89 and clinical *pks*<sup>+</sup> UPEC isolates produce colibactin and induce DNA damage.** a. LC-MS/MS quantification of the C14-Asn cleavage product released following colibactin maturation by the ClbP peptidase in bacterial pellets of UPEC strains UTI89, CFT073 and their respective *ΔclbN* mutants (which are not able to synthesise C14-Asn), and four clinical UPEC strains S7, S238, S245, S257. Quantifications were performed in triplicate and represented as a mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). nd: not detected b. Formation of DNA interstrand cross-links upon exposure of linear double stranded DNA to UTI89, NC101 and their respective *ΔclbP* mutants as well as seven representative clinical human UPEC isolates (S7, S45, S122, S228, S238, S254, S257), visualised by electrophoresis under denaturing conditions. DNA with interstrand cross-links (red arrow) migrates at an apparent molecular weight of twice that of DNA without cross-links. In the absence of any crosslinking DNA migrates as a single denatured strand. The gel shown is representative of three independent experiments. c. S33p-RPA32 and pH2AX immunofluorescence staining of HeLa cells, 16 hours after infection with the reference NC101 strain, its *ΔclbP* mutant or human UPEC strains S45, S122, S228. pH2AX and S33p-RPA32 = pRPA; grayscale. Merged: green = pH2AX; magenta = S33p-RPA32; blue = DAPI; scale bar = 10  $\mu$ m. Human UPEC strains from AS = asymptomatic bacteriuria; IU = cystitis; P = pyelonephritis.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009310.g003>

*pks*<sup>+</sup> UPEC strains induced the formation of nuclear pRPA and pH2AX foci, indicating that the DNA of exposed cell is damaged (Figs 1B and 3C). All together, these results demonstrate that UPEC strains *pks* island are functional, mediate the synthesis of colibactin and are genotoxic.

### Colibactin is produced during UTIs and induces bladder urothelium DNA damage

In order to monitor the expression of the *pks* synthesis machinery during a UTI, we transformed the UPEC strain UT189 with a plasmid expressing a GFP tagged *pks* island-encoded polyketide ClbI synthase from its endogenous promoter. In bladder tissue collected 6 hours after infection, we observed ClbI-GFP expressing bacteria in intracellular bacterial communities (IBCs) inside superficial umbrella cells which line the lumen of the bladder (Fig 4A–4D and S1). Production of colibactin was further confirmed by the detection of C14-Asn in pooled urines from 8 mice 24 hours after infection ( $C = 0.66 \text{ pg}/\mu\text{L}$ ). We next assessed whether the metabolically active *pks* machinery was associated with DNA damage in bladder cells.



**Fig 4. Colibactin is produced during UTI and induces DNA damage.** a–d. Confocal microscopic detection of ClbI-GFP expression and pH2AX in frozen bladder sections, 6 hours post infection with UT189, hosting the *p-clbI-gfp* fusion plasmid. The individual channel images are shown in grayscale, the umbrella cell containing the IBC is circled with a yellow dashed line. In the merged (d) image: blue = DNA, green = ClbI-GFP, magenta = pH2AX, grey = phase contrast. The immunofluorescence staining was repeated three times on different slides, other representative images are shown in S1 Fig. e. Bladder tissue *E. coli* counts, 6 h and 24 h after infection with wild-type *E. coli* UT189 (circles) or  $\Delta$ clbP (squares). Each data point corresponds to one mouse ( $n = 6$ ), with mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) shown for each group. Mann-Whitney U test. f–l. Bladder sections 6 hours post inoculation with wild-type UT189 (f, g) or the isogenic  $\Delta$ clbP mutant (h–l) stained with haematoxylin-eosin (f, h, j), FISH (g, i, k) or DAPI (l, grayscale) all of which detect IBCs (arrows). In the FISH images: blue = DAPI stain DNA; green = FITC-conjugated wheat germ agglutinin (WGA) stained polysaccharides; red = bacterial cells, labelled with the universal 16S FISH probe. The images are representative of the 5 animals per group observed.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009310.g004>

Phosphorylation of H2AX was readily detected in nuclei of umbrella cells containing IBCs, 6 hours after infection with wild-type *E. coli* UTI89 with or without the p-*clbI-gfp* plasmid (Fig 4C and 4D and S1 and S2). A *clbP* mutant unable to produce colibactin was very weakly genotoxic or not genotoxic at all (S2 Fig), although equally capable of colonising the bladder (Fig 4E) and inducing the formation of IBCs (Fig 4F–4L). These results show that colibactin is expressed *in vivo*, in the bladder from the very early stages of UTI and can induce DNA damage.

### Colibactin induces urothelial cell DNA damage in the regenerative compartment

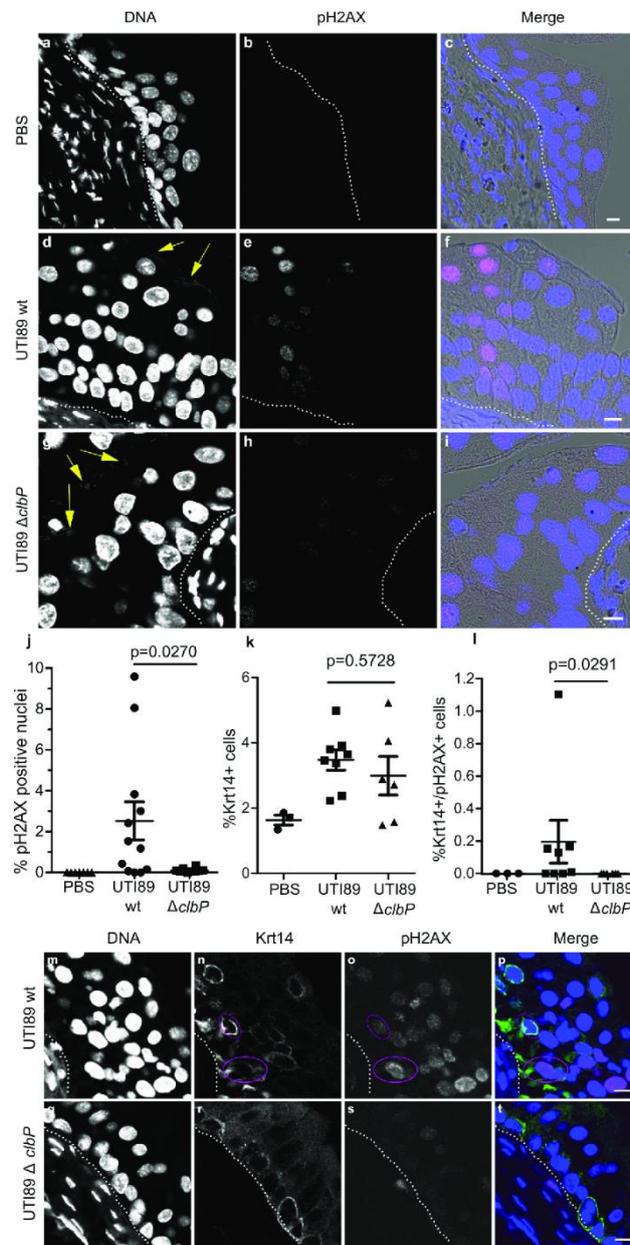
The above results show that colibactin expression occurs as soon as 6 hours after infection, with DNA damage mainly in the nuclei of superficial cells. It is well known from mouse models with UTI89 that these superficial cells, especially those containing IBCs, are exfoliated within 6 to 12 hours [27]. The regeneration of the urothelium with a phase of intense proliferation of intermediate and basal cells occurs 24 hours after infection [27]. In order to study the consequences in terms of genotoxicity for the remaining urothelium of an infection by a colibactin-producing strain, we observed pH2AX in bladder sections 24 hours after wild-type *E. coli* UTI89 infection. We found significant numbers of positive pH2AX nuclei within the urothelium, generally grouped in patches, including cells from the bottom to the top of the urothelium (Fig 5D–5F). Bladders from mice infected with the *clbP* mutant did not exhibit such pH2AX positive cells pattern (Fig 5G–5I) and quantification of the number of positive pH2AX nuclei was significantly lower than in individuals infected with the wild-type strain (Fig 5J). pH2AX positive cells nevertheless reappeared after complementation with the wild-type *clbP* allele (S3 Fig). The DNA damage was not related to apoptosis as pH2AX+ urothelial cells were not detected with TUNEL apoptosis staining (S4 Fig).

The basal urothelium compartment harbours keratin-14 positive (Krt14+) progenitor cells, which are important for urothelium renewal following injury [28]. There was an increase of Krt14+ cells in urothelial tissue infected with either wild-type or *clbP* mutant UTI89 24 hours after infection (Figs 5K and 5S). Interestingly, bladders infected with the genotoxic wild-type UTI89 strain exhibited low but significant numbers of urothelial cells that were positive for both the regenerative cell marker Krt14 and the DNA damage marker pH2AX (Fig 5L–5T). These cells were not positive for Uroplakin, a marker of intermediate and superficial cells (S7 Fig). Thus, during UTI with a *pks+* UPEC, colibactin induces DNA damage in superficial and basal regenerative urothelial cells.

### Discussion

It is now increasingly clear that *pks+* *E. coli* strains found in the intestinal microbiota may play a role in the aetiology and pathogenesis of colorectal cancer. These *E. coli* strains of phylogenetic group B2 are often the same ones responsible for UTIs, but to date, no study has been conducted on colibactin and UTIs. To the best of our knowledge the current study is the first to report the presence of a C14-Asn signature, a metabolite of colibactin production, in the urine of patients infected with *pks+* UPEC. Thus, colibactin is produced during UTIs, one of the most common human bacterial infections worldwide. We used a mouse model of human UTI, to demonstrate that colibactin is produced and that it induces DNA damage in urothelial cells, including in some (low but significant numbers) bladder Krt14+ progenitor cells.

Our study confirms the frequent occurrence of *pks+* UPEC observed in Europe and the US, irrespective of infection severity [10–13]. This high prevalence in human subjects is in contrast to the apparent lack of selective advantages associated with the production of colibactin in



**Fig 5. Colibactin induces DNA damage in urothelial cells of the regenerative compartment. a-i.** Immunofluorescence staining of pH2AX on paraffin-embedded bladder sections 24 hours after PBS inoculation (a-c), or UTI89 wild-type (d-f) or UTI89 $\Delta$ *clbP* (g-i) infection. The individual fluorescence channel images are shown in grayscale. Merged images: blue = DNA, magenta = pH2AX, grey = phase contrast. Yellow arrows highlight bacteria, white dotted lines represent the basal membrane of the urothelium. Scale bar = 10  $\mu$ m. The experiment was repeated twice on 5 to 8 mice, other representative images are shown in S3 Fig. j-l, pH2AX positive nuclei (j), Krt14 positive cells (k) and Krt14 and pH2AX positive cells (l) were counted objectively using Fiji and CellProfiler softwares on the confocal images from large mosaic of bladder sections. Each dot represents one mouse bladder. Mann Whitney U-test performed between UTI89 wild-type and UTI89  $\Delta$ *clbP*. m-t. Paraffin-embedded bladder sections were immunostained for pH2AX and Krt14 24 hours post infection with UTI89 wild-type (m-p) or UTI89 $\Delta$ *clbP* (q-t). The individual fluorescence channel images are shown in grayscale. Merged images: blue = DNA, magenta = pH2AX, green = Krt14. Cells positive for both Krt14 and pH2AX are circled in pink. White dotted lines highlight the basal membrane of the urothelium. Scale bar = 10  $\mu$ m. Other representative images are shown in S6 Fig.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009310.g005>

UTIs mouse models. Our results suggest that colibactin is not essential in our mouse model for the ability of UPEC to colonise the bladder or to form IBCs, whereas colibactin has been shown to play a role in the pathogenicity of *E. coli* in extraintestinal infections such as septicemia or meningitis [29,30]. However, it should be noted that the standard mouse model we used omits a key step in the pathogenesis of UTIs: the domination and emergence from the intestinal reservoir [31]. *E. coli* strains carrying *pks* island are commonly observed among strains with a greater ability to persist in the intestinal microbiota [3]. In addition to the potential role of colibactin in modulating the intestinal microbiota and promoting gut colonisation, enzymes encoded by *pks* island are essential for the synthesis of siderophores and siderophore-microcins [32,33]. Siderophores are major determinants in the domination of the intestinal niche [34]. They confer upon strains that produce them the ability to outcompete other bacteria for iron, a rare essential nutrient. Moreover, siderophore-microcins, antimicrobial peptides which target phylogenetically-linked enterobacteria help UPEC to implant and proliferate within their intestinal reservoir, a step which precedes UTI [10].

The role of *pks* island in UPEC cannot merely be reduced to a determinant of intestinal colonisation. Indeed, our current study shows that the *pks* machinery is also active in the urinary tract and even within IBCs. Bacterial multiplication in these structures is intense, with a doubling time of nearly 30 min, which requires an efficient and optimised bacterial metabolism [35]. Although colibactin is a small molecule, the metabolic cost of its production, *i.e.* expressing and operating the PK-NRP biosynthesis machinery is very high: nearly 1000 times higher than that of peptide synthesis [36]. As UPEC trigger such energetically inexpedient assembly lines during UTIs, one may speculate that they must derive an adaptive benefit from it. Other products of the machinery may possibly confer this advantage. Indeed, there is a wide diversity of metabolites produced by the *pks* machinery (at least *in vitro*), ranging from other putative forms of “colibactins” (such as macrocyclic metabolites) to other smaller metabolites, which potentially vary between strains [15,37]. The biological function of these metabolites remains to be elucidated, but some of these metabolites may be relevant to the pathogenesis of infections. We have, for instance, recently described the synthesis of C12-Asn-GABA, by the *pks* machinery of the probiotic Nissle 1917 strain and shown its digestive pain-relieving activity [38]. The production of such an analgesic metabolite coupled with the increased production of siderophores by *pks+* *E. coli* strains may provide a selective advantage to colonising the urinary tract, in addition to the digestive tract. Future experiments should aim at examining the impact of the various *pks*-associated factors on the course of the infection.

Irrespective of the role of *pks* island in the virulence of UPECs, the fact remains that the archetypical UPEC strain UTI89 is experimentally genotoxic to mouse bladder cells. Colibactin-induced DNA damage can be incompletely repaired, resulting in the accumulation of gene mutations and cell transformation [21,26,39]. We have previously shown that post-exposure

chromosomal instability to colibactin can persist in daughter cells [21]. DNA damage could also be propagated to contiguous cells by the induction of a senescence-associated secretory phenotype in the affected cells and the production of ROS, that could also explain the pattern of pH2AX positive patches of cells 24 hours after infection [39,40]. In the current study, we observed that some murine bladder progenitor cells (Krt14+) display pH2AX positive nuclei. One could speculate about the long-term consequences of such genotoxic stress on the urothelium, especially for patients with recurrent infections. In humans, Krt14 expression characterises undifferentiated bladder cancers with particularly poor prognoses [41,42]. Rodent bladder cancer models indicate that a significant proportion of cancerous tissue derives from Krt14 positive cells [28]. Thus, we could hypothesise that colibactin damage to Krt14+ cells may initiate and propagate DNA lesions. In line with this hypothesis, the colibactin mutational signature has recently been identified in colorectal cancers but also in urinary tract cancers [26,43]. Currently the main risk factors for bladder cancers are tobacco and occupational exposure to solvents, which are more frequently investigated than UTIs [44]. However, a large worldwide bladder cancer case control study recently showed that regular UTIs were epidemiologically associated with an increased risk of urinary bladder cancer [45]. We thus suggest that *pks+* UPEC should be now studied as a possible additional risk factor, particularly in cases of chronic and regular infections, irrespective of whether symptoms are present or not. We detected C14-Asn in the urine of patients with asymptomatic bacteriuria, which are usually not treated with antibiotics and can thus persist for periods of up to many years [46]. A better understanding of the consequences of colibactin production could prompt a systematic search for *pks* island in UPEC isolates or C14-Asn in the urine of patients at risk.

## Materials and methods

### Ethics statement

According to the French regulations relating to observational database analyses, the collection of clinical *E. coli* strains and urine samples did not require specific informed consent. The data were analysed anonymously.

Mouse UTI experiments were performed in accordance with the European directives for the protection of animals used for scientific purposes (2010/63/EU). The local ethics committee from CREFRE-US006 (Regional Centre for Functional Exploration and Experimental Resources) approved the protocol (number CEEA-122 2014–53).

### Bacterial strains

The archetypal *E. coli* strains used in this study were the UPEC strains UTI89 [47], CFT073 [9] and the colitogenic *E. coli* strain NC101 [22]. The  $\Delta clbP$  and  $\Delta clbN$  mutants were constructed using the lambda Red recombinase method [48] with primers IHAPJPN29 and IHAPJPN30 for  $\Delta clbP$  [14] and primers clbN-P1 and clbN-P2 for  $\Delta clbN$  [38]. The pMB702 construct (referred to as p-*clbP*) was used for complementation of the UTI89  $\Delta clbP$  mutant [49]. For the *in vivo* complementation assay, the UTI89  $\Delta clbP$  mutant was transformed with the pCM17-*clbP* plasmid. Briefly, the *clbP* gene was PCR-amplified from pBRSK-*clbP* [49], with primers clbP-F-Bam\_pm (5'-atGGATCCatgacaataatggaacacgtagc-3') and pBRSK-F-Bam\_pm (5'-atGATCCcaagctcgga attaacctc-3') and cloned into the pCM17 vector [50] BamHI site. The ClbI C-terminal GFP fusion was constructed using the Gibson Assembly kit (New England Biolabs, MA, USA). Briefly, the *clbI* and *gfp* genes were amplified by PCR using the following primers: pK184-clbI-gb1 (5'-GATTACGAATTTCGAGCTCGGTACCCATGGCAGAGAATGATTTTGG-3'); clbI-gfp-gb2 (5'-CTTCTCCTTTTCCGCCTCCTCCGCCCTCATTAATCATGTCTTAAGTAG-3'); clbI-gfp-gb3 (5'-

GATTAATGAGGGCGGAGGAGGCGGAAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGG-3') and *gfp*-pK184-gb4 (5'-TGCAGGTCGACCTCGAGGGATCCCCTTATTTGTATAGTTTCATCC ATGCC-3'). A glycine linker (5'-GGCGGAGGAGGCGGA-3') was introduced at the *clbI* and *gfp* junction for flexibility. PCR amplified fragments and *Sma*I-digested pK184 vector were assembled according to the manufacturer's recommendations.

### Collection of clinical strains and urines

The collection of 225 *E. coli* strains from urine samples at the Adult Emergency Department of Toulouse University Hospital, France, between July and October 2017, was previously described [10]. Urine was collected from 223 patients (women and men, under 75 years) with either pyelonephritis (104), symptomatic infections excluding pyelonephritis (cystitis) (83), or asymptomatic bacteriuria (36) without urological comorbidities or catheterisation. All strains were identified as *E. coli* by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (Microflex LT MALDI-TOF MS, Bruker Daltonik GmbH, Germany). Samples of the corresponding urine collected in boric acid tubes were stored at -80°C until lipid analysis.

### C14-Asn quantification

Extraction and quantification of C14-Asn was performed as previously described [38]. Briefly, 5 µL internal standard mixture (Deuterium-labelled compound at 400 ng/mL) was added to the bacterial pellets of 24 h DMEM cultures or to 500 µL of urine samples before crushing, followed by addition of cold methanol (MeOH) (15% final volume) and homogenisation. After centrifugation, supernatants were solid phase extracted on HLB plates (OASIS HLB 2 mg, 96-well plate, Waters, Ireland). Following washing with H<sub>2</sub>O/ MeOH (90:10, v/v) and elution with MeOH, samples were evaporated twice under N<sub>2</sub> and finally resuspended in 10 µL MeOH. Separation and quantification of C14-Asn was performed on a high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry system (G6460 Agilent) [38]. Limit of detection was 2.5 pg and limit of quantification was 5 pg.

### Sequencing data, sequence alignments and phylogenetic analyses

Whole genome sequencing was performed using the Illumina NextSeq500 Mid Output platform (Integragen, Evry, France) to generate 2 x 150 bp paired-end reads, at approximately 80x average coverage. Genome *de novo* assembly and analysis were performed with the BioNumerics 7.6 software (Applied Maths) and Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/>). For SNP-based phylogenetic trees, core genome alignments were generated after mapping raw reads to the *E. coli* MG1655 genome. The core genome phylogenetic tree was inferred with the Maximum-likelihood algorithm using Enterobase for B2 phylogroup strains. Sequences of all isolates are available in the NCBI Database, Bioproject number PRJNA615384 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA615384>).

### Exogenous DNA cross-linking assay

As previously described [18], the pUC19 plasmid, linearised with BamHI, was exposed to bacteria pre-grown ( $3 \times 10^6$  CFU) in DMEM 25 mM Hepes for 40 min at 37°C. The DNA was purified and 100 ng submitted to denaturing gel DNA electrophoresis (40 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH ~12.0). After a neutralisation step, the gel was stained with GelRed and visualised under UV using the ChemiDoc Imaging System (BioRad).

### pH2AX and pRPA immunofluorescence analysis of post infected HeLa cells

HeLa cells (ATCC CCL2) were cultured and infected in 8-well chamber slides (Labtek), as previously described [18]. 24 hours after passaging, HeLa cells were infected with bacteria pre-cultured in DMEM 25 mM HEPES at a multiplicity of infection (MOI) of 50, for 4 h. Cells were then washed and incubated overnight in cell culture medium with 100 µg/ml gentamicin. Immunofluorescence analysis was then performed as previously described [18]. Briefly, cells were pre-extracted in PBS 0.1%, Triton X-100 and fixed in PBS 4% formaldehyde, permeabilised, blocked with MAXblock medium (Active Motif) and stained with antibodies against pH2AX (1:500, JBW301, Millipore) and S33p-RPA32 (1:500, A300-264A, Bethyl), diluted in MAXblock 0.05%, Triton X-100. Cells were washed 3 times for 5 min in PBS 0.05%, Triton X-100 and incubated with secondary AlexaFluor 488 or 568 (Invitrogen) diluted 1:500 in MAXblock medium with 1 µg/ml DAPI (Sigma). Slides were mounted with Fluoroshield (Sigma) and examined on a Leica SP8 laser scanning confocal microscope in sequential mode with LasX software (Leica), while keeping the same laser and detector settings between different wells. Final images were processed with the ImageJ software.

### Mouse UTI model

Female, 6–8 weeks old, C3H/HeN mice (Janvier Labs) were infected transurethrally as previously described [51–53]. Briefly, UPEC were cultivated statically in LB [51] and resuspended to an inoculum of  $10^8$  CFU in 50 µl PBS. Mice under 4% isoflurane anaesthesia were inoculated twice at one-hour intervals with a pump that delivered 10 µL/s. At 6 or 24 hours, mice were euthanised by cervical dislocation (properly performed by experienced personnel), bladders were harvested, homogenised for bacterial enumeration on agar plates, stored in OCT compound at  $-80^{\circ}\text{C}$  or fixed in 4% formaldehyde after filling the bladder prior to paraffin embedding. Each experiment was conducted in duplicate with 5 to 8 mice per group.

### Histological and immunofluorescence analyses of mouse bladder tissue

Histological bladder slices were prepared using standard protocols and processed for haematoxylin-eosin staining then scanned using a Panoramic 250 scanner (3DHistech). Final images were captured using CaseViewer software (3DHistech).

For pH2AX, Krt14 and Uroplakin (Upk) staining on paraffin-embedded bladders, 5 µm thick sections were de-paraffinised and re-hydrated in xylene, ethanol and tap water. Unmasking was performed with a 6-min trypsin digestion (Trypsin-EDTA solution, Sigma, T392) followed by 30 min incubation in citrate buffer pH 6 at  $80\text{--}95^{\circ}\text{C}$ . Sections were then blocked and permeabilised in MaxBlock, 0.3% Triton X100. Slices were stained with anti-pH2AX (Rabbit, Cell Signalling S9718; or Mouse, Millipore #O5-636) at a dilution of 1:200, anti-Krt14 antibodies (Chicken, Ozyme BLE906001) at a dilution of 1:250 and anti-Upk III (Rabbit, Abcam, ab157801) at a dilution of 1:800 in MaxBlock, 0.3% Triton X100. Sections were washed in PBS, 0.05% Triton X100 and incubated with secondary antibodies (Alexa 633 Goat anti-Rabbit antibody, Invitrogen A21071, at a dilution of 1:200 or 1:500; Alexa 555 Goat anti-Chicken antibody, Invitrogen A32932, at a dilution of 1:500; Tetramethylrhodamine Goat anti-Mouse antibody, Invitrogen T2762, at a dilution of 1:200). Images were acquired as with infected cultured cells.

For demonstration of ClbI-GFP reporter expression, to achieve better GFP preservation, we used OCT compound-embedded bladders. Eight µm thick sections were dried on Superfrost plus glass slides, fixed for 15 min in 4% formaldehyde then rinsed with PBS, blocked and permeabilised with MaxBlock, 0.3% Triton X100. Primary anti-GFP (Rabbit, Abcam 6556) and anti-pH2AX (Mouse, Millipore #O5-636) antibodies were diluted at 1:200 in MaxBlock, 0.3%

triton X100. After washing in PBS, 0.05% Triton X100, slides were incubated with secondary antibodies at 1:200 (Alexa 633 Goat anti-Rabbit antibody (Invitrogen A21071) and Alexa 488 Goat anti-Mouse antibody (Life technologies A11029)) and DAPI.

For pH2AX positive nuclei quantification, the Fiji software was used [54]. Briefly, images were analysed in batch with a macro that run a contrast enhancement (saturation = 0.35) and gaussian blur attenuation (sigma = 2) on the DAPI channel. To create a mask on this channel, "Auto threshold" with Otsu dark was used with holes filling and watershed. The "Analyse particles" command was then used to quantify the pH2AX signal within the nucleus region. For each batch of staining and acquisition, nuclei were counted positive when exhibiting a signal greater than 10 times the average signal on sections of the PBS mouse control analysed in parallel.

For Krt14 positive and Krt14/pH2AX positive cells quantification, the CellProfiler software was used [55]. Briefly, images were analysed in batch with a pipeline that first identify nuclei as primary objects with Otsu thresholding. Cells were defined by 6 pixels expansion from nuclei with "Distance-N" method and then cytoplasm were deducted by subtraction. pH2AX intensity in nuclei and Krt14 intensity in cytoplasm were measured and recorded for each cell. pH2AX positive cells were defined like after Fiji analysis. Krt14 positive cells were counted when exhibiting a signal above 3 times the average signal on the whole bladder section on the mosaic confocal image.

For TUNEL-staining of paraffin-embedded bladders, 5  $\mu$ m thick sections were de-paraffinised and re-hydrated in xylene, ethanol and tap water. Sections were then treated by Proteinase K (15  $\mu$ g/ml) in 10mM Tris/HCl (pH 7.8) at 37°C for 30 min and then rinsed twice in PBS, as previously already described for paraffin-embedded bladders [56]. As a positive control, slices from PBS inoculated animals were treated with DNase I (2000 UI in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mg/ml BSA) for 10 min at room temperature. Slices were then TUNEL-stained using the In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche) according to the manufacturer's recommendations. Slices were mounted with Fluoroshield containing DAPI and images were acquired as with infected cultured cells.

### Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) of mouse bladder tissue

Five micron paraffin-embedded bladder sections were de-paraffinised in xylene/ethanol. Sections were incubated in lysozyme solution (10 mg/ml, Sigma, France) for 15 minutes at 37°C and exposed to 100  $\mu$ l of universal bacterial 16 S fluorescent rRNA probe (Eub338, GCTGCCTC CCGTAGGAGT-Cy5', Eurofins, France) at a concentration of 5 ng/ $\mu$ l, in hybridisation buffer (20 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.9 M NaCl, 0.01% SDS) at 46°C for 3 hours [57]. Sections were then incubated in a 48°C prewarmed saline-sodium citrate wash buffer (30 mM sodium citrate, 300 mM sodium chloride, pH7.4, Invitrogen, France) for 20 minutes. To stain polysaccharide-rich content, sections were counterstained with FITC-conjugated wheat germ agglutinin (Invitrogen, France) at a 1:1000 dilution in PBS buffer for 30 min. Slides were mounted with Fluoroshield containing DAPI. Images were acquired using a confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM 710) and final images were processed and edited with the ImageJ software.

### Statistical analyses

Graphical representation and statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 8.3. P values were calculated using two-tailed Mann-Whitney U test.

### Supporting information

**S1 Fig. Immunofluorescence staining of GFP and pH2AX on frozen bladder sections 6 hours post infection with UT189 *p-clbI*-GFP (a-l) and wild-type UT189, non-expressing**

**GFP (m-p).** The individual channel images are shown in grayscale. In the merge images: blue = DNA, green = ClbI-GFP or GFP, magenta = pH2AX, grey = phase contrast. Umbrella cells containing an IBC are circled with a yellow dashed line, the basal side of the urothelium is delimited with a black dotted line. The images are representative of immunofluorescence staining repeated three times on different slides.  
(TIF)

**S2 Fig. Colibactin induces DNA damage in umbrella cells containing IBCs at early stages of infection.** Immunofluorescence staining of pH2AX on paraffin-embedded bladder sections 6 hours post-infection with the wild-type UTI89 (a, b) or the *ΔclbP* isogenic mutant (c,d). The individual channel images are shown in grayscale. Umbrella cells containing IBCs are circled with yellow dashed line and urothelium is delimited with green dotted line.  
(TIF)

**S3 Fig. Colibactin induces DNA damage in urothelial cells.** DAPI (DNA: a, d) and immunofluorescence staining of pH2AX (b, e) on paraffin-embedded bladder sections 24 hours post infection by UTI89 $\Delta clbP$  (a-c) or UTI89 $\Delta clbP$ +pCM17*clbP* (d-f). For immunofluorescence, the individual channel images are shown in grayscale. Merged images: blue = DNA, magenta = pH2AX, grey = phase contrast.  
(TIF)

**S4 Fig. pH2AX positive cells are not apoptotic cells.** TUNEL staining of paraffin-embedded bladder sections 24 hours post PBS inoculation (a-f) or wild-type UTI89 infection (g-j; k-n) in C3H/HeN mice. Sections were treated with DNase I as a TUNEL positive control (d-f). TUNEL staining of infected bladder sections was compared to pH2AX immunofluorescence on a serial section (j is a section next to g-i and n is next to k-m). The individual fluorescence channel images are shown in grayscale. Merged images: blue = DNA; red = TUNEL; green = pH2AX. Yellow dotted lines represent the basal membrane of the urothelium. Scale bar = 100  $\mu$ m.  
(TIF)

**S5 Fig. Increase Krt14 positive cell numbers upon UTI.** Immunofluorescence staining of Krt14 and DAPI stained DNA on paraffin-embedded bladder sections 24 hours post PBS inoculation (a-b) or infection by UTI89 wild-type (c-d) or UTI89  $\Delta clbP$  (e-f). The individual channel images are shown in grayscale. Pink arrows: Areas with Krt14+ cells. Urothelium is delimited with green dotted line. Scale bar = 100  $\mu$ m. Quantification of Krt14 cells is shown in [Fig 5K](#).  
(TIF)

**S6 Fig. Colibactin induces DNA damage in urothelial cells of the regenerative compartment.** Paraffin-embedded bladder sections were immuno-stained for pH2AX and Krt14 24 hours post infection with UTI89 wild-type (a-d) or UTI89  $\Delta clbP$  (e-h). The individual fluorescence channel images are shown in grayscale. Merged images: blue = DNA, magenta = pH2AX, green = Krt14. Cells positive for both Krt14 and pH2AX are circled in pink. Scale bar = 10  $\mu$ m.  
(TIF)

**S7 Fig. Colibactin induces DNA damage in basal Uroplakin-negative cells.** a-c. Immunofluorescence staining of Upk and Krt14 on paraffin-embedded bladder sections 24 hours after UTI89 wild-type infection. d-f. Immunofluorescence staining of Upk and pH2AX on a serial section next to the one shown in a-c. Cells positive for pH2AX but negative for Upk are circled with yellow dashed line. The individual fluorescence channel images are shown in grayscale.

Merged images: green = Upk, red = Krt14, magenta = pH2AX, blue = DNA. White dotted lines represent the basal membrane of the urothelium. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ . f. Insert: higher magnification: green = Upk, magenta = pH2AX, gray = contrast.  
(TIF)

**S1 Table. Human *pks+* UPEC belong to major lineages of phylogroup B2 ExPEC.** Phylogroup, Sequence Types and presence of a *pks* island were determined from whole genome sequences of UPEC isolates, along with the detection of C14-Asn from the corresponding urine.

(DOCX)

**S2 Table. Characterisation of UPEC strains isolated.**

(XLSX)

## Acknowledgments

The authors thank Alexandre Perrat, Frédéric Auvray and Laurent Cavalé for their help with genomic DNA extraction and sequence analysis and Pauline Dragot for her excellent technical help. We thank the technical microbiology laboratory staff from the Toulouse University Hospital for helping to culture and isolate *E. coli* strains. The authors also wish to thank the staff of the Tri GenoToul imaging facility, Toulouse (particularly Sophie Allart and Danièle Daviaud), the experimental histology facility (CREFRE, Toulouse) and the lipidomic facility of MetaToul, Toulouse. The authors thank the team members for their helpful discussions and critical reading of the manuscript and Sébastien Déjean for his help with data analysis.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Jean-Philippe Nougayrède, Eric Oswald.

**Data curation:** Camille V. Chagneau, Clémence Massip.

**Formal analysis:** Camille V. Chagneau, Jean-Philippe Nougayrède.

**Funding acquisition:** Patricia Martin, Eric Oswald.

**Investigation:** Camille V. Chagneau, Clémence Massip, Nadège Bossuet-Greif, Christophe Fremez, Jean-Paul Motta, Céline Besson, Pauline Le Faouder, Maxime Fontanié, Patricia Martin, Jean-Philippe Nougayrède.

**Methodology:** Camille V. Chagneau, Clémence Massip, Nadège Bossuet-Greif, Christophe Fremez, Jean-Paul Motta, Pauline Le Faouder, Nicolas Cénac, Maxime Fontanié, Patricia Martin, Jean-Philippe Nougayrède.

**Project administration:** Eric Oswald.

**Resources:** Clémence Massip, Ayaka Shima, Pauline Le Faouder.

**Supervision:** Marie-Paule Roth, Hélène Coppin, Maxime Fontanié, Patricia Martin, Jean-Philippe Nougayrède, Eric Oswald.

**Validation:** Jean-Philippe Nougayrède, Eric Oswald.

**Visualization:** Jean-Philippe Nougayrède.

**Writing – original draft:** Camille V. Chagneau, Clémence Massip, Jean-Philippe Nougayrède, Eric Oswald.

**Writing – review & editing:** Camille V. Chagneau, Jean-Philippe Nougayrède, Eric Oswald.

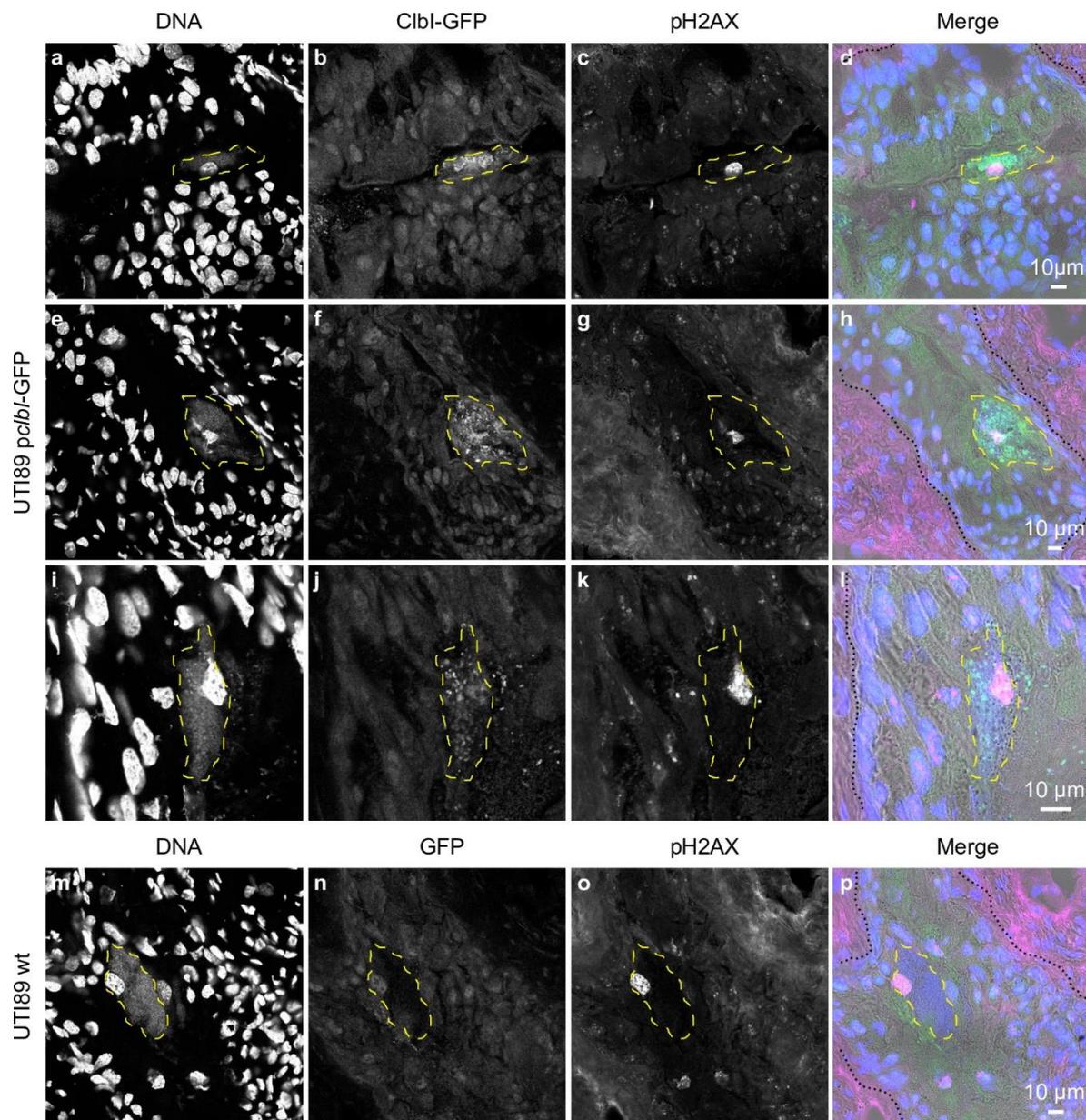
## References

1. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol*. 2015 May; 13(5):269–84. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432> PMID: 25853778
2. Klein RD, Hultgren SJ. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. *Nat Rev Microbiol*. 2020 Feb 18. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0324-0> PMID: 32071440
3. Nowrouzian FL, Oswald E. *Escherichia coli* strains with the capacity for long-term persistence in the bowel microbiota carry the potentially genotoxic pks island. *Microb Pathog*. 2012 Sep; 53(3–4):180–2. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2012.05.011> PMID: 22709536
4. Tenaillon O, Skumik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Mar; 8(3):207–17. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298> PMID: 20157339
5. Mobley HLT, Donnenberg MS, Hagan EC. Uropathogenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus* [Internet]. 2009 Dec 21 [cited 2020 Apr 12]; 3(2). Available from: <http://www.asmscience.org/content/journal/ecosalplus/10.1128/ecosalplus.8.6.1.3>.
6. Ulett GC, Totsika M, Schaale K, Carey AJ, Sweet MJ, Schembri MA. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Curr Opin Microbiol*. 2013 Feb; 16(1):100–7. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.01.005> PMID: 23403118
7. Johnson JR, Russo TA. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus* [Internet]. 2018 Apr 17 [cited 2020 Apr 12]; 8(1). Available from: <http://www.asmscience.org/content/journal/ecosalplus/10.1128/ecosalplus.ESP-0004-2017>. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0004-2017> PMID: 29667573
8. Mobley HLT. Measuring *Escherichia coli* gene expression during human urinary tract infections. *Pathog Basel Switz*. 2016; 5(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens5010007> PMID: 26784237
9. Mobley HL, Green DM, Trifillis AL, Johnson DE, Chippendale GR, Lockett CV, et al. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect Immun*. 1990 May; 58(5):1281–9. <https://doi.org/10.1128/IAI.58.5.1281-1289.1990> PMID: 2182540
10. Massip C, Chagneau CV, Boury M, Oswald E. The synergistic triad between microcin, colibactin, and salmochelin gene clusters in uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbes Infect*. 2020 Jan 16. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.01.001> PMID: 31954842
11. Krieger JN, Dobrindt U, Riley DE, Oswald E. Acute *Escherichia coli* prostatitis in previously healthy young men: Bacterial virulence factors, antimicrobial resistance, and clinical outcomes. *Urology*. 2011 Jun; 77(6):1420–5. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2010.12.059> PMID: 21459419
12. Salvador E, Wagenlehner F, Köhler C-D, Mellmann A, Hacker J, Svanborg C, 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. *Infect Immun*. 2012 Feb; 80(2):668–78. <https://doi.org/10.1128/IAI.06191-11> PMID: 22104113
13. Dubois D, Delmas J, Cady A, Robin F, Sivignon A, Oswald E, et al. Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2010 Jun; 48(6):2122–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.02365-09> PMID: 20375237
14. Nougayrède J-P, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, et al. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*. 2006 Aug 11; 313(5788):848–51. <https://doi.org/10.1126/science.1127059> PMID: 16902142
15. Vizcaino MI, Engel P, Trautman E, Crawford JM. Comparative metabolomics and structural characterizations illuminate colibactin pathway-dependent small molecules. *J Am Chem Soc*. 2014 Jul 2; 136(26):9244–7. <https://doi.org/10.1021/ja503450q> PMID: 24932672
16. Brotherton CA, Balskus EP. A prodrug resistance mechanism is involved in colibactin biosynthesis and cytotoxicity. *J Am Chem Soc*. 2013 Mar 6; 135(9):3359–62. <https://doi.org/10.1021/ja312154m> PMID: 23406518
17. Jiang Y, Stometta A, Villalta PW, Wilson MR, Boudreau PD, Zha L, et al. Reactivity of an Unusual Amidase May Explain Colibactin's DNA Cross-Linking Activity. *J Am Chem Soc*. 2019 Jul 24; 141(29):11489–96. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b02453> PMID: 31251062
18. Bossuet-Greif N, Vignard J, Taieb F, Mirey G, Dubois D, Petit C, et al. The colibactin genotoxin generates DNA interstrand cross-links in infected cells. *Galan JES Philippe J, editor. mBio*. 2018 May 2; 9(2):e02393–17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02393-17> PMID: 29559578
19. Wilson MR, Jiang Y, Villalta PW, Stometta A, Boudreau PD, Carrá A, et al. The human gut bacterial genotoxin colibactin alkylates DNA. *Science*. 2019 Feb 15; 363(6428):eaar7785. <https://doi.org/10.1126/science.aar7785> PMID: 30765538

20. Xue M, Kim CS, Healy AR, Wemke KM, Wang Z, Frischling MC, et al. Structure elucidation of colibactin and its DNA cross-links. *Science*. 2019 Aug 8; eaax2685. <https://doi.org/10.1126/science.aax2685> PMID: 31395743
21. Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrède J-P. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 22; 107(25):11537–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001261107> PMID: 20534522
22. Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, Tomkovich S, Uronis JM, Fan T-J, et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science*. 2012 Oct 5; 338(6103):120–3. <https://doi.org/10.1126/science.1224820> PMID: 22903521
23. Dejea CM, Fathi P, Craig JM, Boleij A, Taddese R, Geis AL, et al. Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science*. 2018 02; 359(6375):592–7. <https://doi.org/10.1126/science.aah3648> PMID: 29420293
24. Dalmaso G, Cougnoux A, Delmas J, Darfeuille-Michaud A, Bonnet R. The bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by modifying the tumor microenvironment. *Gut Microbes*. 2014; 5(5):675–80. <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.969989> PMID: 25483338
25. Buc E, Dubois D, Sauvanet P, Raisch J, Delmas J, Darfeuille-Michaud A, et al. High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. *PLoS One*. 2013 Feb 14; 8(2):e56964. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056964> PMID: 23457644
26. Pleguezuelos-Manzano C, Puschhof J, Huber AR, Hoeck A van, Wood HM, Nomburg J, et al. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks + *E. coli*. *Nature*. 2020 Apr; 580(7802):269–73. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2080-8> PMID: 32106218
27. Wang J, Baturina E, Schneider K, Souza S, Swayne T, Liu C, et al. Polyploid Superficial Cells that Maintain the Urothelial Barrier Are Produced via Incomplete Cytokinesis and Endoreplication. *Cell Rep*. 2018 Oct 9; 25(2):464–477.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.042> PMID: 30304685
28. Papafiotou G, Paraskevopoulou V, Vasilaki E, Kanaki Z, Paschalidis N, Klinakis A. KRT14 marks a sub-population of bladder basal cells with pivotal role in regeneration and tumorigenesis. *Nat Commun*. 2016 Jun 20; 7(1):11914. <https://doi.org/10.1038/ncomms11914> PMID: 27320313
29. McCarthy AJ, Martin P, Cloup E, Stabler RA, Oswald E, Taylor PW. The genotoxin colibactin is a determinant of virulence in *Escherichia coli* K1 experimental neonatal systemic infection. *Infect Immun*. 2015 Sep; 83(9):3704–11. <https://doi.org/10.1128/IAI.00716-15> PMID: 26150540
30. Marcq I, Martin P, Payros D, Cuevas-Ramos G, Boury M, Watrin C, et al. The genotoxin colibactin exacerbates lymphopenia and decreases survival rate in mice infected with septicemic *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 2014 Jul 15; 210(2):285–94. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu071> PMID: 24489107
31. Moreno E, Andreu A, Pigrau C, Kuskowski MA, Johnson JR, Prats G. Relationship between *Escherichia coli* strains causing acute cystitis in women and the fecal *E. coli* population of the host. *J Clin Microbiol*. 2008 Aug; 46(8):2529–34. <https://doi.org/10.1128/JCM.00813-08> PMID: 18495863
32. Massip C, Branchu P, Bossuet-Grief N, Chagneau CV, Gaillard D, Martin P, et al. Deciphering the interplay between the genotoxic and probiotic activities of *Escherichia coli* Nissle 1917. *PLOS Pathog*. 2019 Sep 23; 15(9):e1008029. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008029> PMID: 31545853
33. Martin P, Marcq I, Magistro G, Penary M, Garcia C, Payros D, et al. Interplay between siderophores and colibactin genotoxin biosynthetic pathways in *Escherichia coli*. *PLoS Pathog*. 2013; 9(7):e1003437. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003437> PMID: 23853582
34. Pi H, Jones SA, Mercer LE, Meador JP, Caughron JE, Jordan L, et al. Role of catecholate siderophores in gram-negative bacterial colonization of the mouse gut. *PLoS One*. 2012; 7(11):e50020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050020> PMID: 23209633
35. Justice SS, Hung C, Theriot JA, Fletcher DA, Anderson GG, Footer MJ, et al. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 3; 101(5):1333–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308125100> PMID: 14739341
36. Amoutzias GD, Chaliotis A, Mossialos D. Discovery Strategies of Bioactive Compounds Synthesized by Nonribosomal Peptide Synthetases and Type-I Polyketide Synthetases Derived from Marine Microbiomes. *Mar Drugs*. 2016 Apr; 14(4):80. <https://doi.org/10.3390/md14040080> PMID: 27092515
37. Li Z-R, Li J, Cai W, Lai JYH, McKinnie SMK, Zhang W-P, et al. Macrocyclic colibactin induces DNA double-strand breaks via copper-mediated oxidative cleavage. *Nat Chem*. 2019 Oct; 11(10):880–9. <https://doi.org/10.1038/s41557-019-0317-7> PMID: 31527851
38. Pérez-Berezo T, Pujo J, Martin P, Le Faouder P, Galano J-M, Guy A, et al. Identification of an analgesic lipopeptide produced by the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Nat Commun*. 2017 Nov 3; 8(1):1314. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01403-9> PMID: 29101366

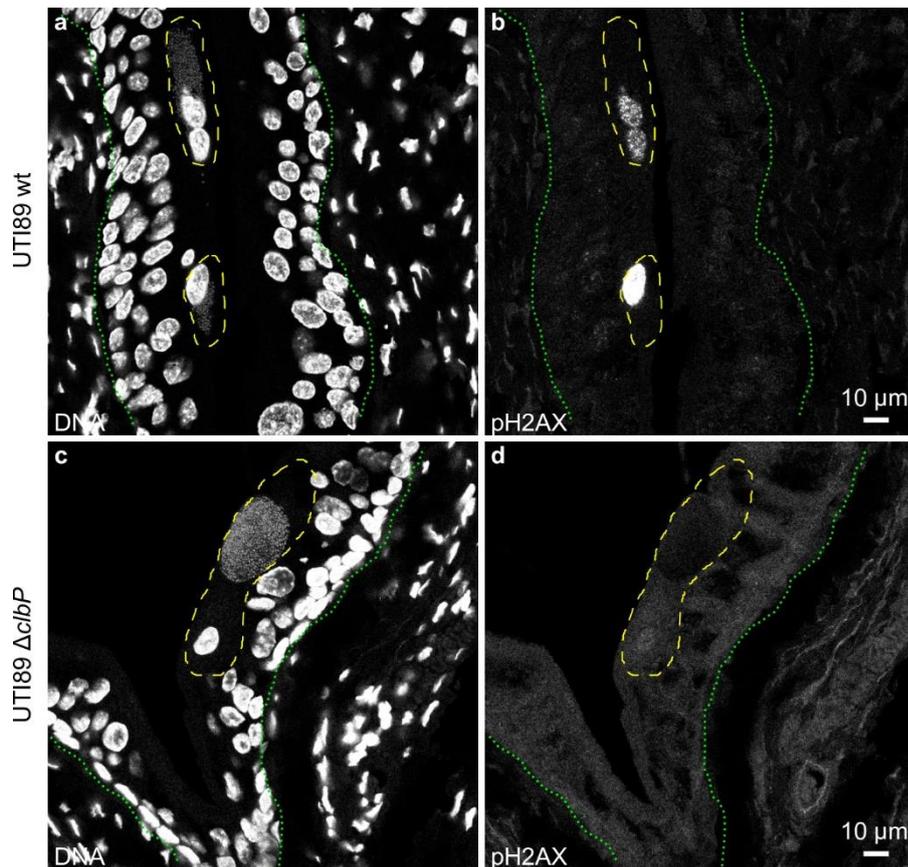
39. Cougnoux A, Dalmasso G, Martinez R, Buc E, Delmas J, Gibold L, et al. Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut*. 2014 Dec; 63(12):1932–42. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305257> PMID: 24658599
40. Secher T, Samba-Louaka A, Oswald E, Nougayrède J-P. Escherichia coli producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian cells. *PLoS One*. 2013; 8(10):e77157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077157> PMID: 24116215
41. Lerner SP, McConkey DJ, Hoadley KA, Chan KS, Kim WY, Radvanyi F, et al. Bladder cancer molecular taxonomy: Summary from a consensus meeting. *Bladder Cancer Amst Neth*. 2(1):37–47. <https://doi.org/10.3233/BLC-150037> PMID: 27376123
42. Volkmer J-P, Sahoo D, Chin RK, Ho PL, Tang C, Kurtova AV, et al. Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Feb 7; 109(6):2078–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120605109> PMID: 22308455
43. Dziubańska-Kusibab PJ, Berger H, Battistini F, Bouwman BAM, Iftekhar A, Katainen R, et al. Colibactin DNA damage signature indicates causative role in colorectal cancer. *Nature Medicine*. 2020 Jun 1;1–7. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0740-8> PMID: 31932805
44. Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Padala SA, Barsouk A. Epidemiology of bladder cancer. *Med Sci Basel Switz*. 2020 Mar 13; 8(1). <https://doi.org/10.3390/medsci8010015> PMID: 32183076
45. Vermeulen SH, Hanum N, Grotenhuis AJ, Castaño-Vinyals G, van der Heijden AG, Aben KK, et al. Recurrent urinary tract infection and risk of bladder cancer in the Nijmegen bladder cancer study. *Br J Cancer*. 2015 Feb 3; 112(3):594–600. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.601> PMID: 25429525
46. Lindberg U, Hanson LA, Jodal U, Lidin-Janson G, Lincoln K, Olling S. Asymptomatic bacteriuria in schoolgirls. II. Differences in escherichia coli causing asymptomatic bacteriuria. *Acta Paediatr Scand*. 1975 May; 64(3):432–6. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1975.tb03860.x> PMID: 1098383
47. Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ. Establishment of a persistent Escherichia coli reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun*. 2001 Jul; 69(7):4572–9. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4572-4579.2001> PMID: 11402001
48. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci*. 2000; 97(12):6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297> PMID: 10829079
49. Dubois D, Baron O, Cougnoux A, Delmas J, Pradel N, Boury M, et al. ClbP Is a prototype of a peptidase subgroup involved in biosynthesis of nonribosomal peptides. *J Biol Chem*. 2011 Oct 14; 286(41):35562–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.221960> PMID: 21795676
50. Morin CE, Kaper JB. Use of stabilized luciferase-expressing plasmids to examine in vivo-induced promoters in the Vibrio cholerae vaccine strain CVD103-HgR. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009 Oct; 57(1):69–79. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00580.x> PMID: 19678844
51. Hung C-S, Dodson KW, Hultgren SJ. A murine model of urinary tract infection. *Nat Protoc*. 2009; 4(8):1230–43. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.116> PMID: 19644462
52. Hannan TJ, Mysorekar IU, Hung CS, Isaacson-Schmid ML, Hultgren SJ. Early Severe Inflammatory Responses to Uropathogenic E. coli Predispose to Chronic and Recurrent Urinary Tract Infection. *PLoS Pathog* [Internet]. 2010 Aug 12 [cited 2018 Sep 13];6(8). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2930321/>
53. Schwartz DJ, Conover MS, Hannan TJ, Hultgren SJ. Uropathogenic Escherichia coli superinfection enhances the severity of mouse bladder infection. *PLoS Pathog*. 2015 Jan; 11(1):e1004599. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004599> PMID: 25569799
54. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jul; 9(7):676–82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019> PMID: 22743772
55. McQuin C, Goodman A, Chernyshev V, Kametsky L, Cimini BA, Karhohs KW, et al. CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology. *PLoS Biol*. 2018; 16(7):e2005970. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005970> PMID: 29969450
56. Jiang T, Huang Z, Chan JY, Zhang DD. Nrf2 protects against As(III)-induced damage in mouse liver and bladder. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Jun 16; 240(1):8–14. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.06.010> PMID: 19538980
57. Motta J-P, Denadai-Souza A, Sagnat D, Guiraud L, Edir A, Bonnart C, et al. Active thrombin produced by the intestinal epithelium controls mucosal biofilms. *Nat Commun*. 2019 Jul 19; 10(1):3224. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11140-w> PMID: 31324782

## Supporting information

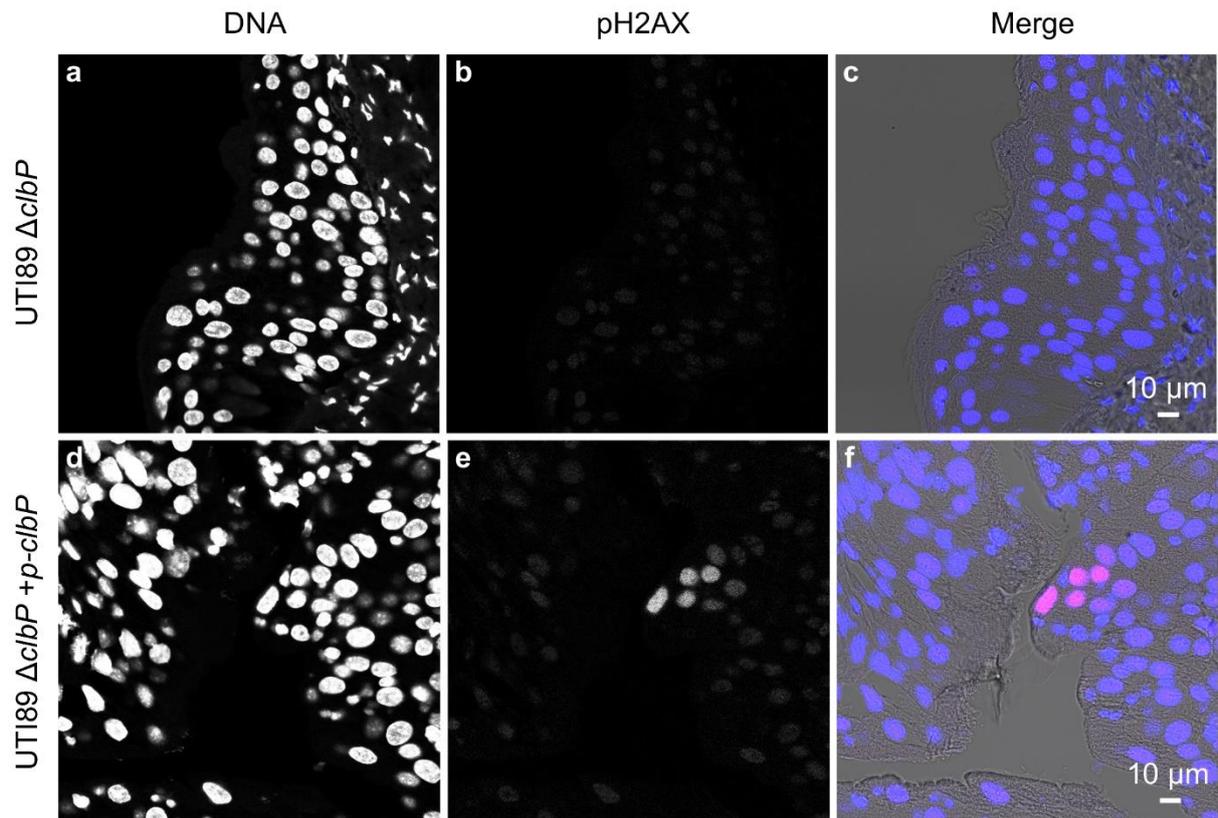


**S1 Fig: Immunofluorescence staining of GFP and pH2AX on frozen bladder sections 6 hours post infection with UTI89 p-clbI-GFP (a-l) and wild-type UTI89, non-expressing GFP (m-p).** The individual channel images are shown in grayscale. In the merge images: blue=DNA, green=ClbI-GFP or GFP, magenta=pH2AX, grey=phase contrast. Umbrella cells containing an IBC are circled with a yellow dashed line, the basal side of the urothelium is

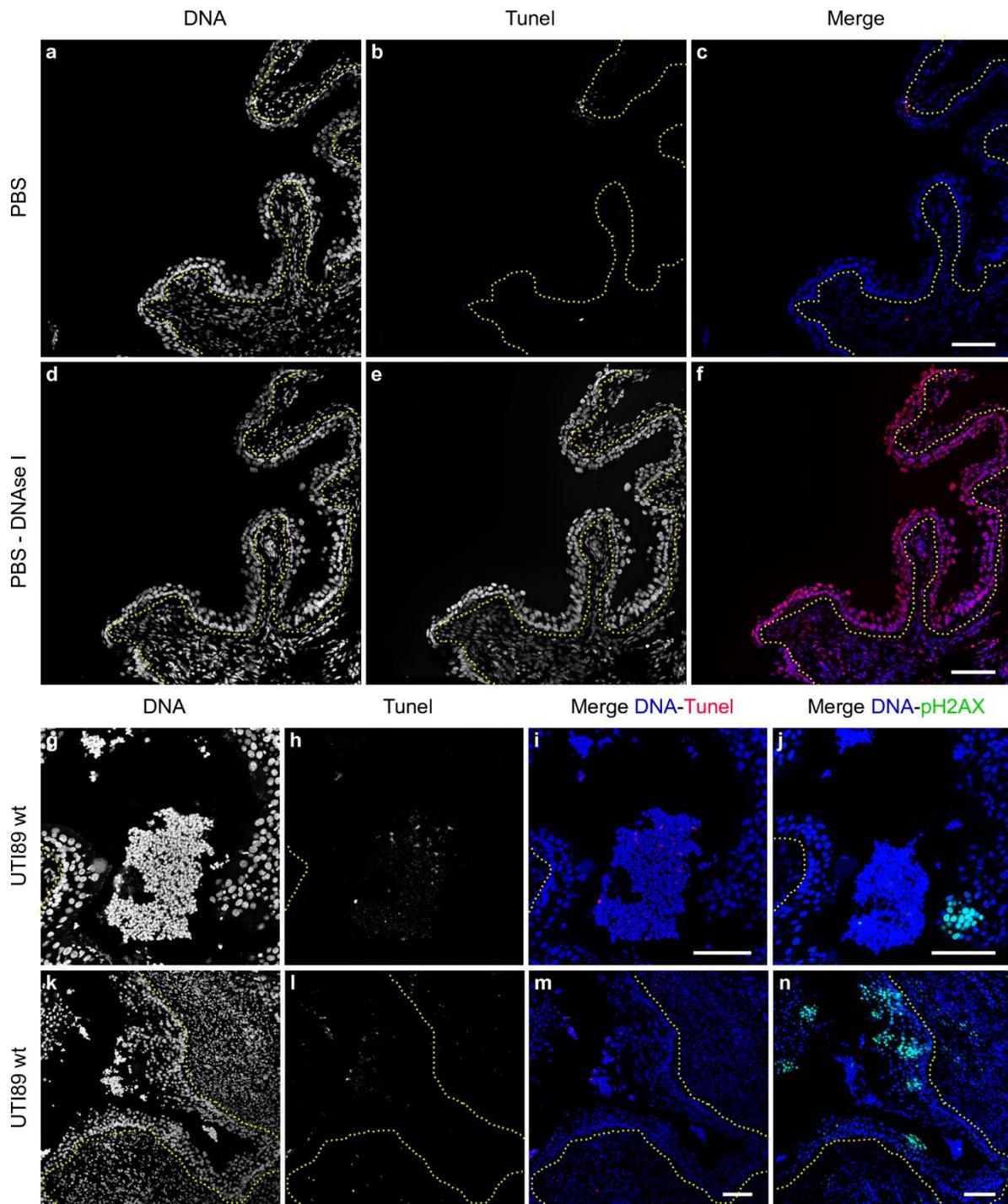
delimited with a black dotted line. The images are representative of immunofluorescence staining repeated three times on different slides.



**S2 Fig: Colibactin induces DNA damage in umbrella cells containing IBCs at early stages of infection.** Immunofluorescence staining of pH2AX on paraffin embedded bladders sections 6 hours post-infection with the wild-type UTI89 (a, b) or the  $\Delta clbP$  isogenic mutant (c,d). The individual channel images are shown in grayscale. Umbrella cells containing IBCs are circled with yellow dashed line and urothelium is delimited with green dotted line.

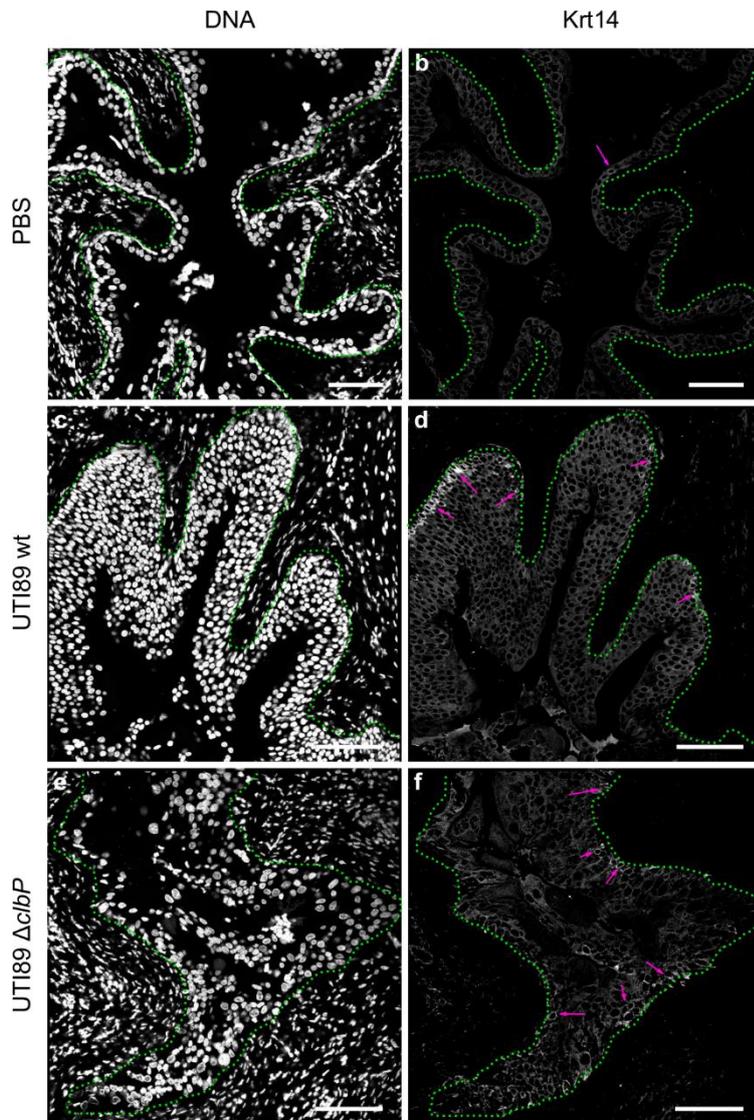


**S3 Fig: Colibactin induces DNA damage in urothelial cells.** DAPI (DNA: a, d) and immunofluorescence staining of pH2AX (b, e) on paraffin-embedded bladders sections 24 hours post infection by *UTI89ΔclbP* (a-c) or *UTI89ΔclbP+pCM17clbP* (d-f). For immunofluorescence, the individual channel images are shown in grayscale. Merged images: blue=DNA, magenta=pH2AX, grey=phase contrast.

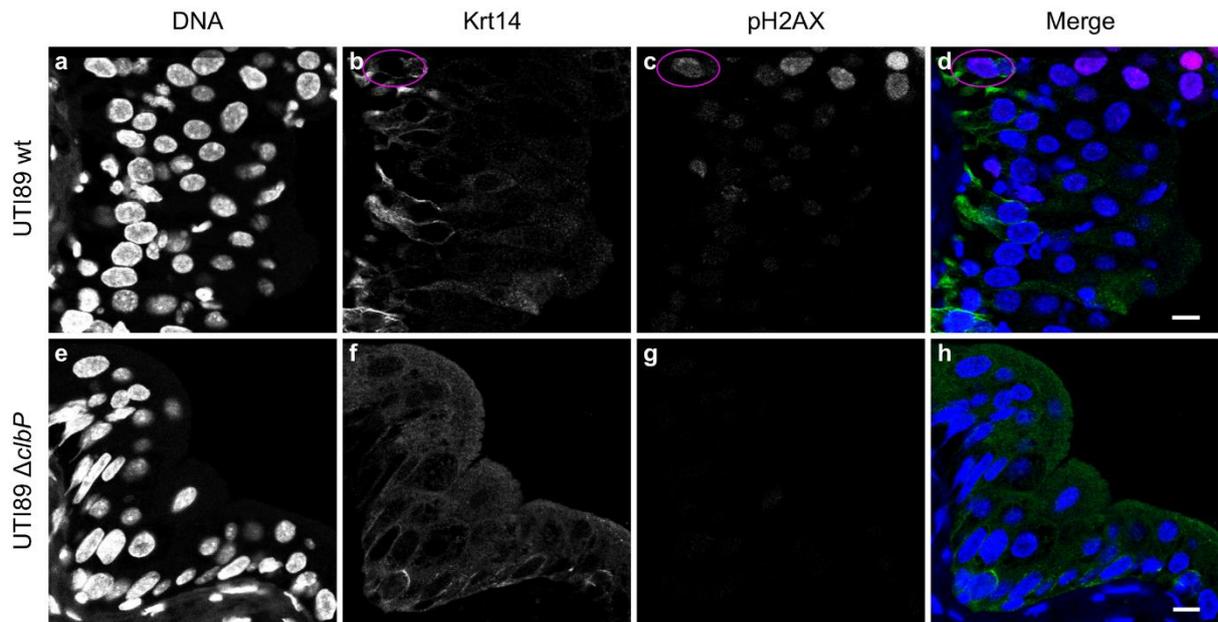


**S4 Fig: pH2AX positive cells are not apoptotic cells.** TUNEL staining of paraffine-embedded bladder sections 24 hours post PBS inoculation (a-c) or wild-type UTI89 infection (g-j; k-n) in C3H/HeN mice. Sections were treated with DNase I as a TUNEL positive control (d-f). TUNEL staining of infected bladder sections was compared to pH2AX immunofluorescence on a serial section (j is a section next to g-i and n is next to k-m). The individual fluorescence channel images are shown in grayscale. Merged images: blue = DNA;

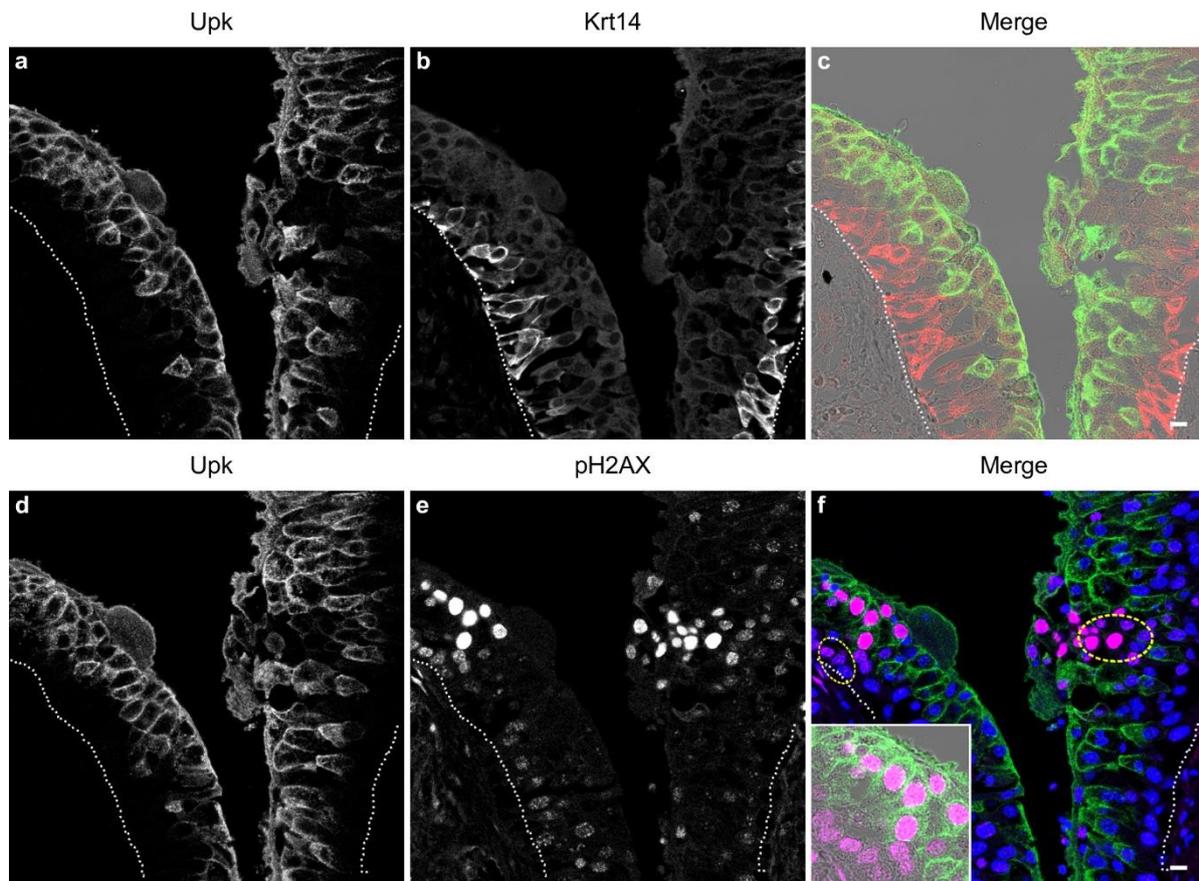
red = TUNEL; green = pH2AX. Yellow dotted lines represent the basal membrane of the urothelium. Scale bar = 100  $\mu$ m.



**S5 Fig: Increase Krt14 positive cell numbers upon UTI.** Immunofluorescence staining of Krt14 and DAPI stained DNA on paraffin-embedded bladders sections 24 hours post PBS inoculation (a-b) or infection by UTI89 wild-type (c-d) or UTI89  $\Delta$ clbP (e-f). The individual channel images are shown in grayscale. Pink arrows: Areas with Krt14+ cells. Urothelium is delimited with green dotted line. Scale bar = 100  $\mu$ m. Quantification of Krt14 cells is shown in Fig 5k.



**S6 Fig: Colibactin induces DNA damage in urothelial cells of the regenerative compartment.** Paraffin-embedded bladders sections were immuno-stained for pH2AX and Krt14 24 hours post infection with UTI89 wild-type (a-d) or UTI89  $\Delta clbP$  (e-h). The individual fluorescence channel images are shown in grayscale. Merged images: blue=DNA, magenta=pH2AX, green=Krt14. Cells positive for both Krt14 and pH2AX are circled in pink. Scale bar = 10  $\mu$ m.



**S7 Fig: Colibactin induces DNA damage in basal Uroplakin-negative cells.** a-c. Immunofluorescence staining of Upk and Krt14 on paraffin-embedded bladder sections 24 hours after UTI89 wild-type infection. d-f. Immunofluorescence staining of Upk and pH2AX on a serial section next to the one shown in a-c. Cells positive for pH2AX but negative for Upk are circled with yellow dashed line. The individual fluorescence channel images are shown in grayscale. Merged images: green = Upk, red=Krt14, magenta = pH2AX, blue = DNA. White dotted lines represent the basal membrane of the urothelium. Scale bar = 10  $\mu$ m. f. Insert: higher magnification: green=Upk, magenta=pH2AX, gray=contrast.

**S1 Table: Human *pks+* UPEC belong to major lineages of phylogroup B2 ExPEC.**

Phylogroup, Sequence Types and presence of a *pks* island were determined from whole genome sequences of UPEC isolates, along with the detection of C14-Asn from the corresponding urine.

Phylogroup	B2							D			Others	Tot.
Sequence Type	73	95	141	404	131	Oth.	Tot.	69	Oth.	Tot.	Others	
n	29	27	16	14	23	46	<b>155</b>	26	8	<b>34</b>	<b>36</b>	225
Infection												
Asymptomatic bacteriuria	4	3	6	0	4	10	27	3	2	5	5	37
Cystitis	13	2	6	8	13	19	61	6	1	7	16	84
Pyelonephritis	12	22	4	6	6	17	67	17	5	22	15	104
<i>pks</i> island												
<i>pks+</i>	29	7	16	14	0	30	96	0	0	0	0	96
C14-Asn+	13	6	12	5	0	19	55	0	0	0	0	55

**S2 Table : Characterisation of UPEC strains isolated.**

ID*	Sexe	Age	CFU/mL	Infection	Bacteriemia	papGI	papGII	papGIII	F17-like	fimH typing	hlyA	Hemolysis	cnf1	sat	mcma	mchB	memLK	iroN	iutA	fyuA	pks	hlyF	cdt	phylogroup	MLST ST	O serotype	H serotype	C14-Asn in urine	
2	F	51	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	88	O8	H19	-	
6	F	34	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH27	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	410	O8	H27	-
7	F	34	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	14	O18	H5	+
8	F	26	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	131	O16	H5	-
9	F	36	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	69	O153	H18	-
10	F	32	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	404	O75	H5	-
11	F	44	10000000	IU	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	355	O2	H5	-
12	F	24	10000000	P	+	-	-	-	-	fimH483	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O2	H4	-
13	F	28	10000000	P	-	-	-	-	-	*	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	703	O16	H6	-
15	F	74	10000000	P	+	-	-	-	-	fimH30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O1	H7	-
18	F	60	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	144	O16	H6	-
20	F	28	10000000	AS	-	-	-	-	-	fimH5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	141	O2	H6	-
22	M	69	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH103	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	73	O6	H1	+
24	F	29	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	69	O117	H4	-
26	F	70	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	69	O153	H2	-
29	F	39	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	117	O161	H4	-
30	F	42	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH296	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	1663	O6	H1	-
31	F	69	10000000	AS	-	-	-	-	-	fimH717	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	73	O18	H1	-
34	M	69	10000000	AS	-	-	-	-	-	fimH197	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	2558	O2	H14	-
35	M	50	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	537	O75	H5	-
36	F	68	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	14	O18	H5	-
40	F	58	10000000	P	+	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O2	H4	-
44	F	21	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	62	O7	H45	-
45	F	71	10000000	AS	-	-	-	-	-	fimH5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	681	O8	H10	+
47	F	30	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH10	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	73	O6	H1	+
48	F	22	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH10	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	73	O6	H1	+
50	F	74	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH30	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	131	O25	H4	-
53	F	46	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	127	O6	H31	+
54	M	69	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O1	H7	-
57	M	66	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH103	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	73	O6	H1	-
60	F	33	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH9	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	73	O6	H1	+
63	M	35	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH30	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	73	O6	H1	+
64	M	66	10000000	AS	-	-	-	-	-	fimH30	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	131	O25	H4	-
65	F	31	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	131	O16	H5	-
66	F	32	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	88	O9	H17	-
69	F	57	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O1	H7	-
70	F	26	10000000	AS	-	-	-	-	-	fimH1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	80	O75	H7	-
71	F	69	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH349	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	104	O22	H1	+
76	F	28	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH24	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	10	-	H4	-
77	F	39	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	404	O75	H5	-
79	M	53	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	69	O15	H18	-
81	F	29	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	1193	O75	H5	-
82	F	23	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	404	O75	H5	-
84	M	69	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH137	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	10	O93	H40	-
86	M	46	10000000	AS	-	-	-	-	-	fimH76	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	998	O2	H6	+
87	F	72	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH92	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	421	O1	H7	-
88	M	34	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH422	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	1064	O75	H5	+
92	F	30	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	538	O13	H4	-
93	F	19	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	1193	O75	H5	-
95	F	69	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O1	H7	-
96	F	24	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	10	O88	H4	-
99	F	61	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	88	-	H12	-

ID*	Sexe	Age	CFU/mL	Infection	Bacteriemia	papGI	papGII	papGIII	F17-like	fimH typing	hiyA	Hemolysis	cnf1	sat	mcmA	mchB	mcmLK	iroN	iutA	fyuA	pks	hiyF	cdt	phylogroup	MLST ST	O serotype	H serotype	Cl4-Asn in urine
100	F	38	100000000	IU	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	B2	404	O75	H5	-
101	F	32	100000000	AS	-	-	-	-	-	fimH42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	B2	131	O16	H5	-
102	F	43	100000000	AS	-	-	-	-	-	fimH27	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	141	O2	H6	+
104	F	67	1000000	AS	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	A	10	O12	H4	-
105	M	65	100000000	IU	-	-	-	-	-	fimH30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	B2	95	O1	H7	-
107	F	20	1000000	P	-	-	-	-	-	fimH41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	B2	131	O153	H5	-
108	F	19	100000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	D	69	O117	H4	-
110	F	21	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH715	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	B2	73	O2	H1	-
112	M	60	100000000	IU	-	-	-	-	-	fimH10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	73	O6	H1	-
113	F	22	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B1	1310	O81	H10	-
117	F	71	100000000	P	+	-	-	-	-	fimH21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	B2	357	O13	H4	-
118	F	69	1000	P	-	-	-	-	-	fimH32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	B1	2179	O9	H9	-
120	M	30	100000000	IU	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	B2	404	O75	H5	+
122	F	23	100000000	IU	-	-	-	-	-	fimH136	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	B2	127	O6	H5	+
124	M	38	100000000	P	-	-	-	-	-	fimH715	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	73	O6	H1	-
129	F	40	100000000	IU	-	-	-	-	-	fimH103	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	73	O22	H1	+
131	F	40	100000000	P	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	D	38	O86	H18	-
134	M	71	100000000	IU	-	-	-	-	-	fimH30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	B2	131	O25	H5	-
135	F	49	100000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	D	69	O117	H4	-
136	F	23	100000000	AS	-	-	-	-	-	fimH54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	A	93	O88	H38	-
139	F	35	100000000	IU	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	B2	404	O75	H5	+
140	F	43	100000000	AS	-	-	-	-	-	fimH202	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	12	O4	H5	-
141	F	24	100000000	P	+	-	-	-	-	fimH146	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	73	O6	H1	+
144	F	19	100000000	P	-	-	-	-	-	fimH10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	73	O6	H1	+
145	F	38	100000000	IU	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	D	69	O15	H6	-
146	F	30	100000000	AS	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	D	69	O15	H18	-
148	F	24	100000000	P	-	-	-	-	-	fimH10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	B2	73	O6	H1	+
149	F	22	100000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	D	69	O153	H2	-
152	M	70	100000000	IU	+	-	-	-	-	fimH22	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	131	O25	H4	-
157	F	17	100000000	IU	-	-	-	-	-	fimH10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	73	O2	H1	+
158	M	72	100000000	IU	+	-	-	-	-	fimH92	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	421	O1	H7	-
159	F	23	100000000	AS	-	-	-	-	-	fimH5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	D	38	O86	H18	-
162	F	26	100000000	P	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	D	38	O86	H18	-
163	F	60	100000000	P	-	-	-	-	-	fimH30	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	73	O6	H1	+
164	M	63	100000	IU	-	-	-	-	-	*	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	C	410	O8	H27	-
166	F	23	100000000	P	-	-	-	-	-	fimH30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	B2	95	O1	H7	-
167	F	28	1000	IU	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	D	69	O15	H18	-
168	M	28	100000000	AS	-	-	-	-	-	fimH356	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	B2	141	O2	H6	+
169	M	63	100000000	AS	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	B2	141	O2	H6	-
170	F	25	100000000	IU	-	-	-	-	-	fimH5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	141	O2	H6	+
174	F	32	100000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	D	69	O17	H4	-
175	F	23	100000000	P	-	-	-	-	-	fimH39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	C	1083	O45	H9	-
183	F	51	100000000	P	+	-	-	-	-	fimH96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	D	362	O23	H31	-
184	F	60	100000000	P	+	-	-	-	-	fimH1463	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	127	O6	H31	+
185	M	68	100000	AS	-	-	-	-	-	fimH144	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	141	O2	H6	+
186	F	36	100000000	IU	+	-	-	-	-	fimH223	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	12	O4	H5	+
187	M	38	100000000	IU	-	-	-	-	-	fimH5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	141	O2	H6	+
189	F	35	100000000	P	+	-	-	-	-	fimH54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	G	117	O161	H4	-
194	F	19	100000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	D	69	O15	H18	-
197	M	37	100000000	IU	-	-	-	-	-	fimH5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	141	O2	H6	+
198	F	51	100000000	P	-	-	-	-	-	fimH9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	B2	372	O75	H31	+
199	F	37	100000000	P	-	-	-	-	-	fimH32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	B1	1126	O9	H25	-
200	F	24	100000000	P	+	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	D	69	O117	H4	-

ID*	Sexe	Age	CFU/mL	Infection	Bacteriemia	papGI	papGII	papGIII	F17-like	fimH typing	hlyA	Hemolysis	cnf1	sat	mcmA	mchB	mcmLK	iron	iutA	fyuA	plk	hlyF	cdt	phylogroup	MLST ST	O serotype	H serotype	C14-Asn in urine
201	F	21	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH41	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	B2	131	O16	H5	-	
203	F	19	1000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	D	69	O25	H18	-	
204	F	25	10000000	AS	-	-	-	-	-	fimH30	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	B2	131	O25	H4	-	
205	F	24	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH5	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	B2	141	O2	H6	+	
206	F	49	10000	P	-	-	-	-	-	fimH39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	10801	O78	H4	-	
207	M	62	10000000	AS	-	-	-	-	-	fimH13	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	B2	73	O2	H1	+	
208	F	40	10000000	AS	-	-	-	-	-	fimH45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	10	O168	H4	-	
209	F	40	10000000	AS	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	69	O17	H18	-	
212	F	46	1000000	IU	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	404	O75	H5	-	
213	F	16	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH41	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	59	O1	H7	-	
214	M	55	10000000	IU	+	-	-	-	-	fimH5	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	B2	141	O2	H6	-	
215	F	39	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH30	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	B2	95	O1	H7	-	
216	F	26	1000000	IU	-	-	-	-	-	fimH39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	88	O8	H17	-	
217	F	29	10000000	AS	-	-	-	-	-	fimH5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	569	O134	H31	-	
218	F	22	10000000	AS	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	2556	O13	H4	-	
219	F	28	10000000	AS	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	69	O15	H1	-	
220	M	53	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B1	58	O9	H12	-	
221	M	53	100000	IU	-	-	-	-	-	fimH30	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	131	O25	H4	-	
222	F	71	10000000	IU	+	-	-	-	-	fimH30	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	73	O6	H1	+	
224	F	50	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	131	O16	H5	-	
226	M	43	1000000	IU	-	-	-	-	-	fimH10	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	B2	73	O6	H1	-	
227	F	19	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	404	O75	H5	-	
228	F	75	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O1	H7	+	
229	F	49	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH30	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O1	H7	-	
230	F	20	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH30	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	131	O25	H4	-	
231	M	17	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	648	O174	H42	-	
232	F	28	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	2076	O17	H18	-	
233	F	20	1000000	P	-	-	-	-	-	fimH30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	95	O1	H7	-	
234	F	19	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	141	O2	H6	+	
235	F	42	1000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	69	O117	H4	-	
236	M	47	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH10	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	73	O6	H1	-	
237	F	59	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH10	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	73	O6	H1	-	
238	F	18	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	404	O75	H5	+	
239	F	22	10000000	P	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	636	O21	H7	-	
240	M	24	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	404	O75	H5	-	
241	F	49	100000	IU	-	-	-	-	-	fimH180	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	127	O6	H31	-	
242	M	23	10000	IU	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B1	295	O159	H11	-	
243	M	50	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	127	O6	H31	+	
244	F	26	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	69	O17	H18	-	
245	F	23	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	80	O7	H7	+	
246	F	32	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	62	O7	H45	-	
247	F	23	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH30	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	73	O6	H1	+	
248	F	20	1000000	IU	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	73	O6	H1	-	
250	F	20	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH106	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	12	O4	H1	+	
251	F	21	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH483	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	69	O86	H18	-	
252	F	29	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	131	O16	H5	-	
253	F	38	100000	IU	-	-	-	-	-	fimH92	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	421	O1	H7	-	
254	F	44	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O1	H7	+	
256	F	25	10000000	P	+	-	-	-	-	fimH5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	141	O2	H6	+	
257	M	43	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH12	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	73	O6	H1	+	
258	F	47	10000000	P	+	-	-	-	-	fimH30	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O1	H7	+	
260	F	28	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	69	O17	H18	-	
262	F	40	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	141	O2	H6	+	

S2 Table

ID*	Sexe	Age	CFU/mL	Infection	Bacteriemia	papGI	papGII	papGIII	F17-like	fimH typing	hiyA	Hemolysis	cnf1	sat	mcmA	mcHb	memLK	iron	iutA	fyuA	plk	hiyF	cdt	phylogroup	MLST ST	O serotype	H serotype	Cl4-Asn in urine
263	F	66	10000000	IU	+	-	-	-	-	fimH3	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	B2	681	O8	H10	+
264	F	71	10000000	P	-	-	-	+	+	fimH223	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	B2	12	O4	H5	-
265	F	37	10000000	P	-	-	+	-	-	fimH30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O1	H7	-
266	F	61	1000	P	-	-	-	-	-	fimH32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B1	162	O32	H19	-
267	F	62	1000	AS	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	131	O25	H4	-
268	M	74	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	69	O17	H18	-
269	F	24	10000000	P	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O1	H7	-
270	F	59	10000000	AS	-	-	-	-	-	fimH30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O1	H7	-
271	M	74	10000000	P	-	-	-	+	+	fimH197	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	B2	2015	O2	H14	+
272	F	60	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	968	O2	H1	+
273	M	53	10000000	IU	-	-	-	+	+	fimH5	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	B2	141	O2	H6	+
274	F	21	1000000	AS	-	-	-	-	-	fimH45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	10	O30	H6	-
275	F	65	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	569	O134	H31	-
276	F	72	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O1	H7	+
277	F	24	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	131	O25	H4	-
278	F	70	10000000	P	+	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	69	O15	H6	-
279	F	31	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH92	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	B2	421	O1	H7	-
281	F	26	1000	P	-	-	-	-	-	fimH54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	10	O89	H10	-
282	F	39	10000000	AS	-	-	-	-	-	fimH44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	62	O7	H45	-
283	F	64	10000000	AS	-	-	-	+	+	fimH2	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	B2	127	O6	H31	-
285	F	66	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	10	O9	H9	-
286	F	22	10000000	AS	-	-	-	-	-	fimH5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	38	O102	H6	-
287	M	43	10000000	IU	-	-	-	+	+	fimH5	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	B2	537	O75	H5	-
288	F	25	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	404	O75	H5	-
289	F	22	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	404	O75	H5	-
290	F	28	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	405	O2	H4	-
291	F	17	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	404	O75	H5	+
292	F	26	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	69	O117	H4	-
293	F	27	1000000	IU	-	-	-	-	-	fimH41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	131	O16	H5	-
294	F	20	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	69	O17	H18	-
295	F	20	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O2	H7	+
296	F	34	1000000	P	-	-	-	-	-	fimH31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B1	453	O23	H16	-
297	M	15	100000	IU	-	-	-	-	-	fimH32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B1	58	O154	H21	-
298	F	73	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH5	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	B2	141	O2	H6	+
299	F	67	10000000	AS	-	-	-	-	-	fimH30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O2	H7	+
300	F	32	1000000	P	-	-	-	-	-	fimH30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O1	H7	-
301	F	20	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	144	O16	H6	-
302	F	64	10000000	AS	-	-	-	+	+	fimH5	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	B2	141	O2	H6	+
303	M	67	1000000	AS	-	-	-	+	+	fimH10	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	B2	73	O2	H1	-
304	F	69	10000000	IU	+	-	-	-	-	fimH30	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	B2	131	O25	H4	-
306	F	18	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	131	O16	H5	-
307	F	69	10000000	IU	-	-	-	-	-	fimH145	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	457	O11	H25	-
309	F	31	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O1	H7	-
311	F	16	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O25	H4	-
312	F	36	10000000	P	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	38	O86	H18	-
314	F	19	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O2	H7	-
315	F	53	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	404	O75	H5	+
316	F	69	10000000	IU	-	-	-	+	+	fimH13	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	B2	73	O2	H1	-
317	F	34	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O25	H4	-
318	M	68	10000000	AS	+	-	-	+	+	fimH106	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	B2	12	O4	H1	+
319	F	20	1000000	P	-	-	-	-	-	fimH41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	131	O16	H5	-
320	F	24	1000000	P	-	-	-	-	-	fimH10	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	B2	73	O6	H1	-
321	M	45	10000000	P	-	-	-	-	-	fimH30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2	95	O2	H4	-

S2 Table

ID*	Sexe	Age	CFU/mL	Infection	Bacteriemia	papGI	papGII	papGIII	F17-like	fimH typing	hlyA	Hemolysis	cnf1	sat	mcmA	mchB	memLK	iroN	iuuA	fyuA	pks	hlyF	cdt	phylogroup	MLST ST	O serotype	H serotype	C14-Asn in urine
322	F	21	100000000	P	-	-	+	-	+	fimH30	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	B2	131	O25	H4	-	
323	F	17	100000000	IU	-	-	+	-	+	fimH10	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	B2	73	O6	H1	+	
324	F	33	100000000	IU	-	-	+	-	-	fimH483	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	D	69	O86	H18	-	
325	F	19	100000000	IU	-	-	-	-	-	fimH35	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	C	23	O8	H9	-	
326	M	47	100000000	IU	-	-	+	-	+	fimH30	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	B2	131	O25	H4	-	
327	F	55	100000000	P	+	-	+	-	-	fimH41	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	F	59	O1	H7	-	
329	F	22	100000000	AS	-	-	-	-	+	fimH2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	B2	127	O6	H31	-	
330	F	65	100000000	AS	-	-	-	-	-	fimH15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	B2	95	O18	H7	+	
331	M	45	100000000	IU	-	-	-	-	-	fimH207	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	B2	131	O25	H4	-	
332	F	26	100000	AS	-	-	+	-	+	fimH10	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	B2	73	O2	H1	-	
333	M	50	100000000	IU	-	-	-	-	-	fimH54	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	A	10	O86	H2	-	
335	F	21	100000000	IU	-	-	-	-	+	fimH204	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	B2	12	O4	H5	+	
336	F	33	100000000	P	-	-	+	-	-	fimH27	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	D	69	O17	H18	-	
338	F	31	100000000	P	-	-	+	-	+	fimH27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	B2	1057	O75	H5	+	

\* colored ID: patients with 2 *E. coli* strains

AS: asymptomatic bacteriuria; IU: non-pyelonephritis symptomatic UTI (cystitis); P: pyelonephritis

fimH typing \* = Unknown or presumptive new variant

## Discussion et perspectives

Le travail expérimental présenté dans cette thèse a permis d'aborder la place et le rôle de l'îlot *pks* dans un nouveau contexte jusque-là non exploré : celui des infections urinaires qui sont majoritairement causées par *E. coli*. L'îlot *pks* est ainsi présent chez plus de 40% des UPEC, notamment en association avec d'autres facteurs de virulence avec lesquels il interagit de manière fonctionnelle : un îlot microcine tronqué et un locus *iro*. Durant l'infection urinaire, la machinerie *pks* est exprimée, comme en témoigne le C14-Asn mis en évidence pour la première fois dans des urines humaines. En parallèle, des dommages à l'ADN surviennent dans les cellules urothéliales, y compris dans les cellules progénitrices. Nous discuterons ici du rôle pour la bactérie et dans la relation hôte-pathogène et des conséquences des métabolites de l'îlot *pks* dans ce cadre particulier des infections urinaires (Figure 24 & Figure 26).

## 1) Quel est le rôle de l'îlot *pks* ?

### A) L'îlot *pks* : présent et exprimé malgré un coût métabolique important

Avant d'envisager les effets potentiellement bénéfiques pour la bactérie ou les communautés bactériennes, il faut souligner l'effet significatif d'une machinerie de biosynthèse telle que celle codée par l'îlot *pks* sur le métabolisme et le fitness bactérien. Le coût métabolique de production de composés PK-NRP est en effet très largement supérieur à celui de peptides. Pour l'ajout d'un monomère, un module protéique d'environ 3kb est nécessaire, soit près de 1000 fois plus que le nombre de nucléotides nécessaire à l'ajout d'un acide aminé (Amoutzias et al. 2016). La colibactine est donc bien plus chère à produire qu'une « simple » toxine protéique. L'existence et la persistance dans l'évolution de telles machineries de biosynthèse pose ainsi question. Il semble qu'avant tout elles doivent répondre aux principes de base de ce qu'on pourrait appeler le « taylorisme bactérien » : (i) pour avoir été sélectionnées dans l'évolution les micro-organismes doivent en tirer quelque bénéfice, si cette machinerie avait été inutile elle n'aurait pas persisté ; (ii) le fonctionnement de ces machineries doit être optimisé au maximum, c'est-à-dire son expression régulée très finement pour survenir au moment optimal et perturber au minimum le fitness bactérien et d'autre part son organisation spatiale intra-bactérie doit être la plus efficace possible pour permettre un assemblage des métabolites efficace, par exemple sous forme d'un complexe des différentes enzymes d'assemblage. Malgré ces différents éléments, l'îlot *pks* s'est disséminé et demeure extrêmement bien conservé entre les différentes souches porteuses (Auvray et al. 2021).

Dans un contexte d'infection ou de colonisation, une perte de fitness bactérien peut être particulièrement délétère pour la bactérie en cause. C'est le cas notamment dans les infections urinaires, où la croissance bactérienne est exponentielle dans l'urine et en intra-cellulaire permettant le maintien des bactéries malgré les mictions. Durant l'infection urinaire, les UPEC font face à de nombreux obstacles qui constituent un véritable goulet d'étranglement sélectionnant les bactéries avec le meilleur fitness (métabolisme, invasion des cellules urothéliales...) (Hannan et al. 2012). De manière intéressante, malgré une croissance importante, des gènes de la machinerie *pks* sont transcrits comme cela a pu être montré dans une étude de transcriptomique *in vivo* sur des urines de patients colonisés par *E. coli* ABU83972 (Hancock et al. 2008). De même dans notre étude utilisant un rapporteur UT189 pCIBI-GFP on note l'expression de CIBI dans les communautés bactériennes intracellulaires, 6 heures après infection (du moins dans une partie des bactéries, ce qui pourrait être en faveur de l'optimisation de l'expression et de l'économie collective). Or c'est justement durant cette phase précoce de l'infection que les UPEC se multiplient le plus rapidement, avec des temps de doublement proches de 30 min (soit proches de ceux de phase exponentielle en culture *in vitro*) (Justice et al. 2004). Une étude adressant l'impact sur le fitness en réalisant une expérience de compétition entre une souche sauvage et une souche délétée de l'ensemble de l'îlot *pks* en modèle murin d'infection urinaire pourrait être intéressante pour compléter ces données. Néanmoins cette expression malgré des conditions de forte croissance avec des besoins métaboliques élevés suggère l'existence d'un bénéfice lié pour la bactérie ou la communauté bactérienne. D'autre part, la forte prévalence (près de 40%) de l'îlot *pks* chez les UPEC semble indiquer sinon l'avantage lié à l'îlot *pks* du moins l'absence d'effet délétère de sa présence qui aurait conduit à sa contre sélection durant l'évolution.

## B) L'îlot *pks* : un rôle potentiel dans la virulence ?

### 1) Rôle des dommages liés à la génotoxine colibactine dans la virulence

Comme nous l'avons vu, l'îlot *pks* est expérimentalement associé à la virulence dans différents modèles d'infections telles que le sepsis ou les méningites néonatales (Marcq et al. 2014; McCarthy et al. 2015). En modèle de sepsis, l'augmentation de la virulence raccordée à la colibactine serait liée à l'exacerbation d'une lymphopénie (Marcq et al. 2014). Les dommages à l'ADN entraînent en effet une apoptose des lymphocytes, qui est retrouvée dans les rates des souris infectées. Une immunomodulation est également notée dans des modèles de cancer colorectal avec une lymphopénie T (Lopès et al. 2020). Notons cependant que l'impact de l'îlot *pks* sur la virulence décrit

dans les différents modèles expérimentaux ne peut être qu'en partie attribué à la génotoxine colibactine, car l'utilisation de mutants d'enzymes pléiotropes comme ClbA et ClbP ne permet pas avec certitude d'exclure l'impact d'autres métabolites dont nous discuterons par la suite.

Dans le modèle murin d'infection urinaire aiguë utilisé, les analyses d'expression de cytokines classiquement impliquées dans la réponse aux infections réalisées par nos collaborateurs n'ont pas permis de mettre en évidence de différence (exacerbation ou suppression) de réponse immunitaire attribuable à la colibactine après une infection par UTI89 (données non publiées ; C. Besson, H. Coppin, M.-P. Roth).

Il peut être intéressant de faire le parallèle avec une autre génotoxine dont le rôle n'est pas clairement élucidé : la toxine typhoïde de *Salmonella enterica* serovar Typhi à l'origine de la fièvre typhoïde ; de structure apparentée à CDT. Chez l'Homme, la présence de la toxine ne semble pas indispensable à l'infection aiguë (Gibani et al. 2019). Au contraire d'un effet délétère, la production de la génotoxine induit même des effets anti-inflammatoires qui sont protecteurs et bénéfiques à la survie de l'hôte lors de l'infection aiguë en modèle murin (Belluz et al. 2016; Guidi et al. 2016). Dans cette étude, la toxine typhoïde est également associée à une plus grande fréquence de portage asymptomatique. Plus que la virulence et une réponse immune initiale exacerbée qui aboutirait à leur élimination, les bactéries produisant cette toxine semblent promouvoir la survie de leur hôte et la persistance de leur réservoir pour favoriser leur dissémination. Dans la mesure où nous n'avons pas observé d'impact clair sur la virulence dans l'infection aiguë de l'îlot *pks* et qu'une forte proportion de souches de bactériuries asymptomatiques sont *pks+*, on peut faire l'hypothèse d'une même stratégie pour les UPEC producteurs de colibactine. De plus, comme nous l'avons vu en introduction, d'autres génotoxines peuvent être produites par les UPEC : Usp et CDT. Des modèles d'infections plus longues, voire chroniques ou récurrentes pourraient être plus pertinents pour explorer les conséquences sur la réponse de l'hôte et le rôle potentiel de la colibactine dans les infections urinaires, qui demeure à ce jour élitif.

Les dommages à l'ADN induits par la colibactine pourraient également avoir un impact et jouer un rôle potentiellement bénéfique sur les bactéries et la communauté bactérienne. Ainsi une prépublication récente suggère que la colibactine induirait la réponse SOS chez les bactéries en contact (Silpe et al. 2021). Il est intéressant de citer en parallèle une étude portant sur des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques qui, en induisant la réponse SOS, vont favoriser des phénotypes propices à la colonisation urinaire (piliation, formation de biofilm...) (Goneau et al. 2015). La colonisation aiguë mais également les récurrences sont favorisées. Il serait intéressant de voir si un tel mécanisme peut être en jeu via la réponse aux dommages à l'ADN liés à la colibactine dans le

cadre d'infections urinaires chroniques. On pourrait ainsi imaginer un avantage global de la production de colibactine qui pourrait être produite par une fraction des bactéries et avoir des effets favorables sur l'ensemble de la population bactérienne. Cette hypothèse d'économie métabolique est cohérente avec les images observées des communautés bactériennes intracellulaires formées par UTI89 pCIBI-*GFP* où l'ensemble des bactéries ne semble pas exprimer le rapporteur.

De manière plus hypothétique, l'induction de dommages à l'ADN par la colibactine et ainsi de mutations chez les bactéries dans la communauté pourrait également représenter un avantage évolutif (Sokurenko 2016). En effet, ces mutations permettent l'adaptation plus rapide et plus facile à l'environnement. Ainsi, il y a plus de souches mutant facilement chez les UPEC que parmi les souches commensales digestives (Denamur et al. 2002). En modèle murin, l'uropathogène *E. coli* CFT073 délété du gène *mutS* qui code pour le système de réparation des mutations persiste plus longtemps au sein du tractus urinaire que la souche sauvage (Labat et al. 2005). *In vivo* durant l'infection ces dommages semblent en partie liés à la réponse immunitaire inflammatoire (notamment via la production d'espèces réactives de l'oxygène), mais on peut imaginer un rôle additionnel de la production de colibactine. Dans cette perspective il serait intéressant de commencer par étudier l'impact sur le taux de mutation de la génotoxine dans différentes conditions, en particulier se rapprochant de celles rencontrées *in vivo*.

## 2) Rôle d'autres métabolites liés à l'îlot *pks* sur la réponse de l'hôte et notamment la douleur

D'autres métabolites sont plus spécifiquement associés à l'îlot *pks*. Ainsi la production d'aminolipides à activité anti-douleur a été mise en évidence tout d'abord chez le probiotique *E. coli* Nissle1917 (Pérez-Berezo et al. 2017). Devant une activité probiotique diminuée lors de l'administration d'un mutant *clbA* en comparaison de la souche sauvage dans un modèle murin de colite (Olier et al. 2012), l'hypothèse a été faite que des composés bénéfiques pour l'hôte pouvait être produits, menant à la découverte du C12-Asn-GABA (Pérez-Berezo et al. 2017). Son impact a été démontré uniquement en modèle d'hypersensibilité viscérale digestive induite par la capsaïcine (Pérez-Berezo et al. 2017).

Si sa pertinence est évidente dans le cadre d'un probiotique, on peut cependant faire l'hypothèse que la production d'un métabolite à activité anti-douleur pourrait également participer à la virulence des UPEC, comme un mécanisme de modification de la réponse de l'hôte leur permettant de passer inaperçus. Cela pourrait permettre l'établissement d'une colonisation ou infection durable a- ou pauci-symptomatique tout comme la progression vers une infection sévère en masquant le premier signe d'alerte qu'est la douleur. Cette stratégie physiopathologique est déjà décrite et l'exemple le

plus frappant est certainement celui de l'ulcère de Buruli, où la production de mycolactones perturbant la signalisation douloureuse et la survie neuronale permet à *Mycobacterium ulcerans* d'induire des nodules indolores retardant leur prise en charge (Guarner 2018).

Dans le cadre des infections urinaires, différents pré-requis sont nécessaires à d'éventuelles extrapolations : d'une part, la compréhension des conditions nécessaires à la production de ces aminolipides, notamment pour atteindre des concentrations entraînant des effets biologiques significatifs durant une infection urinaire ; d'autre part l'éventuelle influence du fond génétique de des UPEC (voire des souches bactériuries asymptomatiques) dans la synthèse de ce métabolite. En termes de douleur vésicale, nous avons réalisé des essais en partenariat avec le Dr Nicolas Cénac (équipe 3, IRSD, Toulouse, Inserm) et la société Urosphère (Toulouse) qui développe des modèles d'évaluation de la douleur suite à des cystites chimio-induite (Augé et al. 2013). L'administration de C12-Asn-GABA n'avait pas permis de moduler la douleur dans ce modèle mais d'autres doses et d'autres schémas mériteraient potentiellement une investigation plus approfondie.

Enfin on ne peut exclure la synthèse de d'autres métabolites via l'îlot *pks* non décrits pour le moment mais qui pourraient avoir une activité complémentaire sur la relation hôte pathogène. Ainsi, très récemment, il a été mis en évidence un *cross-talk* entre la synthèse de l'aminomalonyl par la voie *pks* et la synthèse des lipides, à l'origine de nouveaux métabolites de la famille  $\gamma$ -lactames connue pour posséder diverses activités biologiques (Kim et al. 2021). L'activité précise de ces métabolites de biosynthèse inédite reste à être étudiée.

### 3) D'autres facteurs impliqués dans la colonisation urinaire ?

L'îlot *pks*, comprenant au sens large les métabolites produits grâce à lui, ses enzymes et ses interactions avec d'autres machineries de biosynthèse, pourrait jouer un rôle également dans la colonisation du tractus urinaire.

En première place il conviendra d'évoquer les sidérophores, essentiels dans la captation du fer, qui est un processus clé dans l'infection urinaire notamment. Lorsque les bactéries arrivent dans le tractus urinaire elles sont en effets confrontées à de faibles concentrations en fer et à une séquestration de ce dernier. La PPTase ClbA est pléiotrope et peut permettre d'activer les machineries de biosynthèse de l'entérobactine, des salmochélines et de la yersiniabactine (Martin et al. 2013). Une augmentation des capacités de synthèse des sidérophores via ClbA qui répond à la carence en fer (Tronnet et al. 2016) pourrait permettre de favoriser la colonisation et donc la virulence lors d'une infection urinaire. Dans le cadre de bactériuries asymptomatiques dont les

souches sont de très bonnes colonisatrices et qui assureraient une certaine protection contre les infections urinaires symptomatiques par un phénomène d'interférence et de compétition nutritionnelle vis-à-vis des UPEC, la production de sidérophores est cruciale (Watts et al. 2012). En termes de compétition, grâce à l'interaction entre les îlots *pks*, microcines et le locus *iro*, il y a également synthèse de sidérophores-microcines à activité antibactérienne qui peut favoriser la persistance seule de la souche colonisatrice du tractus urinaire (Massip et al. 2019).

L'îlot *pks* pourrait également apporter un avantage au cours de l'infection urinaire en apportant une protection complémentaire à la bactérie via ClbS. Comme nous l'avons vu précédemment, l'îlot *pks* code pour une protéine de protection, ClbS, qui prévient l'autotoxicité de la colibactine (Bossuet-Greif et al. 2016). Elle agit grâce à une activité cyclopropane hydrolase qui hydrolyse la tête réactive de la colibactine à l'origine de la fixation à l'ADN (Tripathi et al. 2017). Ainsi, dans un mutant DH10B  $\Delta clbS$ , la production de colibactine induit une réponse SOS, l'équivalent de la signalisation des dommages à l'ADN chez les bactéries (Bossuet-Greif et al. 2016). Exprimée de façon ectopique par des cellules HeLa, ClbS protège également ces dernières de l'action génotoxique de la colibactine (Bossuet-Greif et al. 2016). De plus, des orthologues de ClbS existent chez des espèces bactériennes phylogénétiquement éloignées et non-productrices de colibactine, protégeant ses dernières contre les effets de la toxine (Silpe et al. 2021). Il a été montré que ClbS se fixait préférentiellement sur les extrémités d'ADN simple et double brin avec une affinité augmentée pour les sites riches en A et T (ciblés préférentiellement par la colibactine) et pour les ADN avec des structures anormales comme avec des ponts inter-brins induits par le cisplatine (Tripathi and Bruner 2021). Ces éléments suggèrent potentiellement un rôle additionnel dans le processus de signalisation et réparation des dommages à l'ADN liés à la colibactine.

De manière intéressante, ClbS pourrait également assurer une protection supplémentaire de l'ADN vis-à-vis d'autres sources de dommages à l'ADN (Molan et al. 2019). Elle assure ainsi l'auto-protection contre une autre génotoxine, Usp, et limite la réponse SOS induite (Molan et al. 2019). L'ADN préincubé avec ClbS purifié est également moins sensible à des nucléases comme la DNase I (Molan et al. 2019). L'équipe auteure de ces travaux envisage ainsi un rôle plus global à ClbS, comme protecteur de l'ADN, qui pourrait conférer un avantage sélectif, par exemple contre les ROS produits lors d'une infection par les défenses immunitaires de l'hôte. Dans des études de transcriptomique sur des urines de patients infectées, le gène *clbS* est d'ailleurs parmi les plus exprimés de l'îlot, indiquant l'importance de cette protéine durant une infection (Hancock et al. 2008). Durant une infection urinaire, les défenses de l'hôte médiées notamment par TLR4 induisent une réponse SOS

importante chez les bactéries, ce qui participe au phénotype de filamentation observé dans les IBC tardives (Justice et al. 2006; Li et al. 2010). L'exigence d'une réponse SOS fonctionnelle pour la colonisation urinaire souligne la place importante des dommages à l'ADN comme réponse de l'hôte à l'infection, notamment intracellulaire (radicaux, monoxyde d'azote...). Dans ce type d'infections, la protection potentiellement conférée par ClbS a pu être un des facteurs de sélection de l'îlot *pks*. Pour en tester le bénéfice, il pourrait être intéressant de réaliser des expériences de compétition entre des UPEC (producteurs ou non de colibactine) *clbS*<sup>+</sup> versus *clbS*<sup>-</sup>.

C) L'îlot *pks* : un facteur de colonisation intestinale plus qu'un facteur de virulence ?

Les résultats de deux études n'abondent pas en faveur d'un rôle clair de l'îlot *pks* dans la virulence au cours des infections urinaires. D'une part, d'un point de vue épidémiologique l'îlot n'est pas plus présent chez les souches d'infections plus sévères : c'est même l'inverse qui est mis en lumière avec les gènes de l'îlot *pks* plus fréquemment retrouvés dans les bactériuries asymptomatiques que dans les pyélonéphrites.

D'autre part, en modèle murin d'infection urinaire, le mutant UTI89  $\Delta clbP$  ne présente pas de défaut de colonisation significatif comparé à la souche UTI89 wt, que ce soit en termes de quantification bactérienne ou bien de capacité à former des communautés bactériennes intracellulaires. Bien que l'îlot *pks* ne se limite pas à cette enzyme et que d'autres mutants pourraient avoir un impact différent qu'il serait intéressant de tester (y compris dans des expériences de compétitions) ces résultats ne vont pas dans le sens d'un rôle franc de l'îlot *pks* et de ses métabolites connus dans la virulence au cours d'une infection urinaire aiguë. Ces effets pourraient également être étudiés dans des modèles d'infections à plus long terme voire chroniques. Nos résultats sont corroborés par un essai de compétition réalisé entre un mutant *E. coli* CFT073  $\Delta clbJ$  et la souche CFT073wt dans laquelle les auteurs observent même une colonisation rénale à l'avantage du mutant (Shea et al. 2020).

Cependant ces modèles murins d'infection urinaire par injection transurétrale bactérienne omettent une étape clé dans la physiopathologie des infections urinaires : la colonisation digestive préalable. L'établissement d'un réservoir intestinal est en effet préalable et primordial à la survenue d'une infection urinaire, qu'elle soit symptomatique ou non. L'îlot *pks* pourrait ainsi jouer un rôle dans la constitution de ce réservoir, favorisant la colonisation plus que la virulence comme le suggèrent les données épidémiologiques de notre étude.

L'hypothèse d'un rôle de l'îlot *pks* dans la colonisation intestinale a été formulée très tôt, suite à la description dans des études épidémiologiques d'une part croissante d'individus des pays industrialisés possédant des *E. coli* du groupe B2 au sein de leur microbiote intestinal en corrélation avec un portage de souches *pks+* (Nowrouzian and Oswald 2012). Dans différents modèles murins, différents mutants de l'îlot *pks* sont impactés dans leur capacité de s'établir au sein du microbiote (McCarthy et al. 2015; Lu et al. 2017). L'impact de l'îlot *pks* dans la colonisation résiderait avant tout dans des mécanismes de compétitions inter-bactéries permettant le développement de la population *pks+* au détriment des autres bactéries. Ainsi, en modèle monoxénique, la perte de fonctionnalité de la machinerie *pks* n'entraîne pas de défaut de colonisation (Nougayrède et al. 2021).

Un des premiers métabolites suspecté d'activité antibactérienne a été la colibactine, devant une structure PK-NRP dont font partie de nombreux antibiotiques. En comparant le microbiote intestinal suite à l'administration de ces souches produisant ou non la colibactine grâce à un mutant ponctuel dans un modèle de transmission mère-enfant, des différences ont ainsi été mises en évidence (Tronnet et al. 2020). La production de colibactine modifie le microbiote, d'abord en impactant les Proteobacteria dont font partie les *E. coli* puis des phyla plus éloignés (Tronnet et al. 2020). Le mécanisme en cause n'est pas élucidé : en effet d'une part la colibactine joue un rôle sur l'hôte qui en retour pourrait modifier le microbiote et d'autre part aucune activité antibiotique directe de la colibactine *stricto sensu* n'a jamais été démontrée *in vitro*. Plus récemment, une activité antibactérienne indirecte de la colibactine a été révélée via les phages dans une prépublication (Silpe et al. 2021). Ainsi, la colibactine, comme d'autres agents génotoxiques, serait capable d'induire la réplication lytique de prophages en activant la réponse SOS. Ce cycle lytique va induire directement la lyse de la cellule bactérienne cible mais pourrait également favoriser la réplication des phages et donc leur dissémination, conférant ainsi potentielle une action à distance sur des bactéries non en contact avec la génotoxine. C'est cette induction de phages qui pourrait peut-être expliquer l'activité antimicrobienne liée à l'îlot *pks* décrite au préalable sur des souches de *Staphylococcus aureus* y compris multi-résistants (Faïs et al. 2016).

L'aminolipide C14-Asn aurait également une activité antibactérienne modérée, démontrée sur *Bacillus subtilis* sans que les auteurs ne rendent compte du spectre sur lequel il a été testé et si d'autres bactéries du microbiote intestinal pourrait être impactées (Vizcaino et al. 2014).

Enfin l'îlot *pks* et plus précisément ClbP est impliqué dans la maturation de sidérophores-microcines chez les souches à l'îlot microcines tronqué (Massip et al. 2019). Ces sidérophores-microcines ont une activité anti-microbienne plutôt ciblée, dirigée vers les bactéries phylogénétiquement proches et jouent un rôle primordial dans la compétition inter-bactéries notamment au niveau intestinal. Ainsi

leur production par le probiotique *E. coli* Nissle 1917 permet de diminuer la colonisation et la pathogénicité du pathogène *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en modèle murin d'infection (Massip et al. 2019). De manière intéressante, la production de sidérophores-microcines fonctionnelles chez les souches avec un îlot tronqué repose sur l'association de trois îlots de pathogénicité : îlot microcines tronqué ; îlot *pks* et locus *iroA*, normalement dédié à la transformation de l'entérobactine en salmochélines mais dont la glucosyltransférase IroB permet ici la modification du précurseur sidérophore avant son couplage à la microcine (Massip et al. 2019). Cette triade est retrouvée dans la collection d'UPEC issue d'infections urinaires communautaires (Massip et al. 2020). Elle est en effet présente chez plus d'un quart des souches (62/225), sans corrélation avec la sévérité de l'infection urinaire. Plus que l'îlot *pks* seul il semble que ce soit cette triade qui soit un facteur de colonisation digestif. Cette association épidémiologique forte suggère une co-sélection de ces différents îlots de pathogénicité, permettant également une « économie de génome » basée sur le pléiotropisme de différentes enzymes. Au vu de sa prévalence chez les UPEC, on peut faire l'hypothèse que cette simplification et non-redondance de fonctions a représenté un avantage en termes d'évolution grâce à l'acquisition d'un avantage compétitif associé à d'autres facteurs de virulence potentiels (colibactine et métabolites liés à l'îlot *pks* et salmochélines).

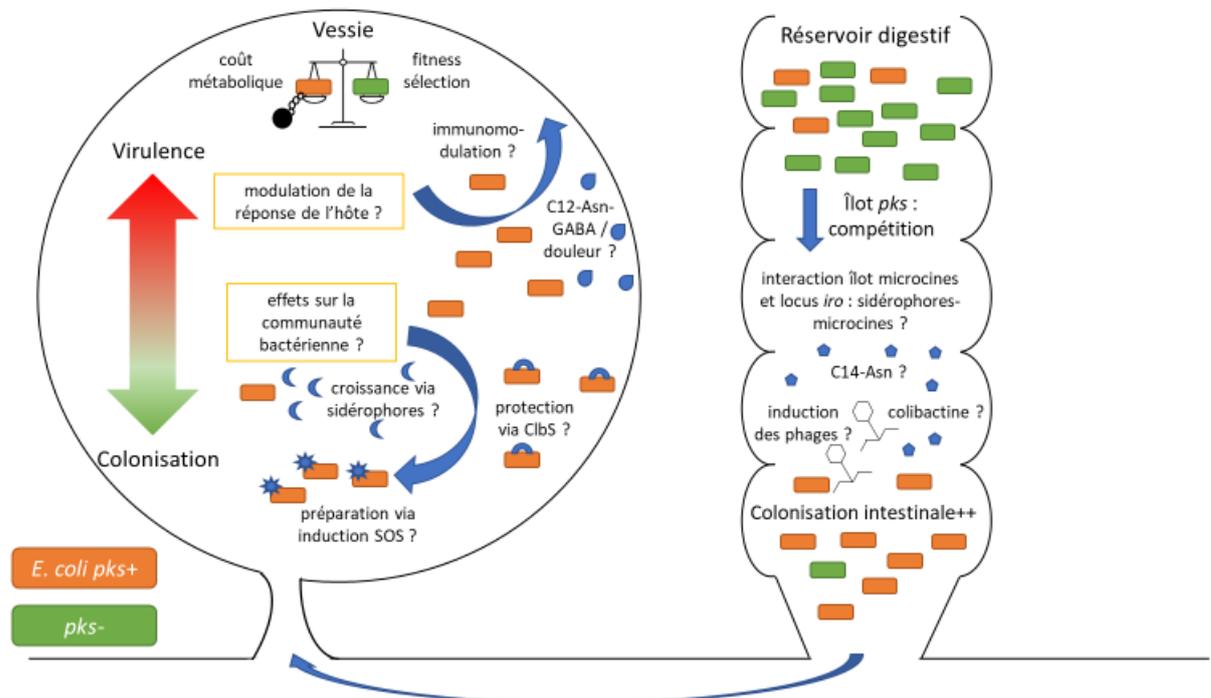


Figure 24 : Quel est le rôle de l'îlot *pks* dans les infections urinaires ? L'îlot *pks* est présent et exprimé chez les UPEC malgré un coût métabolique important. Durant l'infection urinaire il pourrait jouer un rôle dans la virulence via la modulation de la réponse de l'hôte mais également impacter la communauté bactérienne et favoriser la colonisation urinaire. Sa place est peut-être plus importante comme facteur favorisant la formation du réservoir intestinal des UPEC via la production de différents métabolites impliqués dans la compétition inter-bactéries. Voir le texte pour les détails.

Bien que tous les mécanismes ne soient pas encore élucidés, l'îlot *pks* semble donc être avant tout un facteur bénéfique à la colonisation intestinale des bactéries grâce à la synthèse de différents métabolites et par l'intermédiaire d'activités anti-microbiennes favorisant leur compétitivité. Son rôle dans la pathogénicité et la virulence dans les infections urinaires, du moins dans la phase aiguë, demeure équivoque.

## II) Quelles sont les conséquences sur l'hôte des UPEC *pks+* ?

### A) Des dommages à l'ADN observés lors de l'infection

Quel que soit le rôle pour la bactérie de l'îlot *pks* et de ses métabolites, il n'en demeure pas moins que la machinerie de biosynthèse est exprimée durant l'infection urinaire. L'utilisation d'un rapporteur pCIBI-*GFP* cloné dans UTI89 montre l'expression dès les premières heures de l'infections. Cette dernière est confirmée par la mise en évidence du métabolite C14-Asn dans les urines de souris infectées mais également et pour la première fois chez des patients. Il est relargué lors de la maturation terminale de la génotoxine colibactine, et contrairement à elle possède l'avantage d'être stable et facilement quantifiable. Il s'agit ainsi d'un reflet de la production de la génotoxine *in vivo* durant une infection urinaire, y compris chez l'Homme.

La production de colibactine est associée à des dommages à l'ADN comme en témoigne la phosphorylation de l'histone H2AX qui survient en réponse. En modèle expérimental, ces dommages sont observés dès 6h après l'infection, essentiellement au niveau des cellules superficielles de la vessie qui sont envahies par les communautés bactériennes intracellulaires. Or ces cellules superficielles, en particulier celles infectées, subissent un intense processus d'exfoliation 6 à 12 h après le début de l'infection (Wang et al. 2018). Les dommages à l'ADN de ces cellules n'ont donc probablement qu'un faible impact à long terme. En revanche, à 24 h d'infection, l'urothélium entame une phase intense de prolifération et de renouvellement à partir des cellules basales et intermédiaires pour justement régénérer son intégrité et la barrière formée par les cellules superficielles. C'est à ce temps précisément que nous retrouvons de manière reproductible la plus intense augmentation de pH2AX au sein des cellules urothéliales, concernant jusqu'à près de 10% des cellules de certains individus suite à l'infection par UTI89 wt mais pas par UTI89  $\Delta$ *clbP* non producteur de colibactine. De manière intéressante, les dommages à l'ADN touchent des cellules de toutes les couches de l'urothélium, y compris des cellules basales positives pour le marqueur Krt14 qui sont considérées comme des progénitrices de la vessie. Nous avons également analysé des tissus

après de plus longs temps d'infection (de 48 h à 4 semaines après infection) au sein desquelles on observe une décroissance du signal pH2AX, ce qui n'exclut pas la présence de dommages et surtout de dommages antérieurs mais indique une diminution de la réponse à ces dommages (données non publiées) (Figure 25).

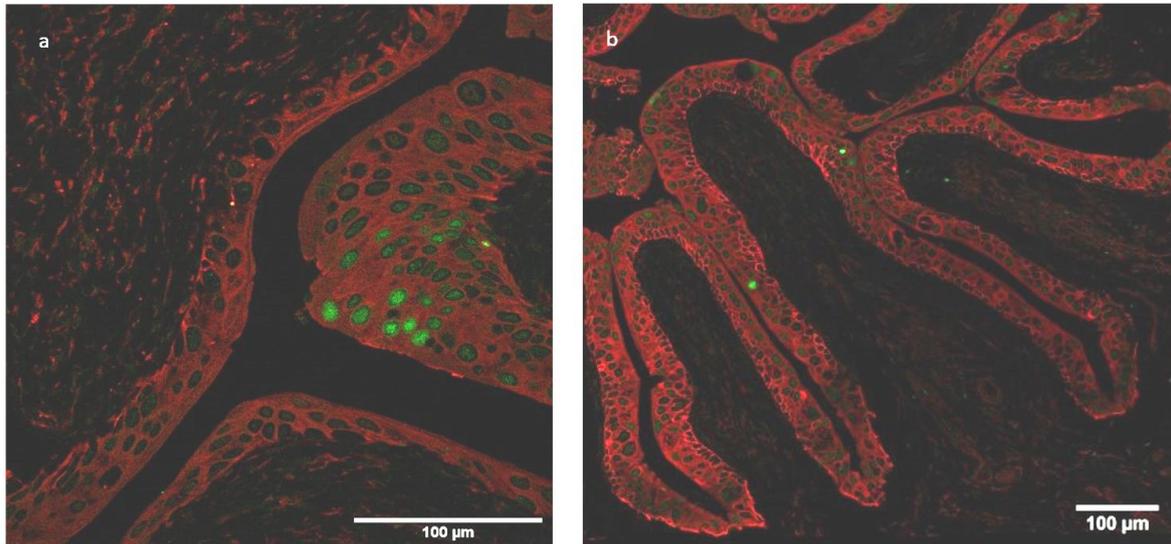


Figure 25 : Coupes de vessies murines incluses en paraffine 72h (a) et une semaine (b) après une infection par *E. coli* UT189. pH2AX (vert) et Krt14 (rouge) ont été marqués en immunofluorescence par le même protocole que dans l'article 2 (Chagneau et al. 2021). A 72h de rares noyaux faiblement positifs pour pH2AX et groupés sont retrouvés. A une semaine, il ne reste que de rares noyaux positifs isolés.

Différentes interrogations sont soulevées par ces observations inédites. Premièrement en termes de cinétique, la réponse aux dommages est essentiellement observée à 24 h après l'infection. Pour expliquer cette particularité, on peut avancer plusieurs hypothèses : une charge bactérienne plus importante ou encore la perte de la barrière protectrice assurée par les cellules superficielles qui ont été exfoliées dans les premières heures. Comme nous l'avons vu cette période correspond à une régénération intense de l'urothélium, où transcription et réplication cellulaires vont être mises à contribution. Or la réponse aux dommages à l'ADN induits par la colibactine est intimement liée au cycle cellulaire et à la transcription (par exemple détection du blocage des fourches de réplication). L'augmentation du signal pH2AX plus spécifiquement à ce temps pourrait donc être secondaire en partie à la régénération cellulaire.

Cependant, il est intéressant de noter que l'ensemble des individus infectés par UT189 wt ne présentent pas tous la même exacerbation du signal pH2AX. Elle touche approximativement la moitié des souris étudiées, les autres présentant un signal proche de celles infectées par UT189  $\Delta clbP$ . Cette importante hétérogénéité n'est pas un artefact de coupe car elle est confirmée sur différentes profondeurs du tissu. Des résultats préliminaires sur un sous-groupe de souris montrent également

que certains individus ont une inflammation au niveau de la vessie plus importante (par exemple  $Il6$  ;  $Il1\beta$  ;  $SOCS3$  ;  $CXCL1$ ) (C. Besson, données non publiées). De manière intéressante, il existe une certaine corrélation qui retrouve des dommages à l'ADN intenses essentiellement chez des individus avec une inflammation vésicale plus prononcée. Cependant, l'inflammation seule ne peut pas expliquer la survenue des dommages puisqu'elle est également retrouvée sans différence significative chez les individus infectés par UTI89  $\Delta clbP$  qui eux ne présentent pas d'augmentation du signal p $H2AX$ . Cette dépendance à l'inflammation est également retrouvée dans d'autres modèles digestifs où a été testé l'impact de la colibactine notamment sur le cancer. L'inflammation, qu'elle soit induite chimiquement, par inactivation de  $Il10$  ou par d'autres bactéries comme *B. fragilis*, semble être un paramètre essentiel à l'action génotoxique de la colibactine et surtout à ses conséquences pro-carcinogènes (Arthur et al. 2012, 2014; Dejea et al. 2018; Yang et al. 2020). Les mécanismes à l'origine sont mal connus mais pourraient inclure une modulation de l'expression de l'îlot *pks*, du microbiote, ou encore de la réponse de l'hôte au dommage. Il serait intéressant d'explorer plus en détail le rôle précis de l'inflammation dans la formation des dommages à l'ADN précisément dans l'infection urinaire, notamment pour voir s'ils peuvent être modulés ou réduits par certains médicaments et d'autre part pour comprendre pourquoi on observe cette variabilité inter-individuelle en modèle murin.

D'autre part, en plus de l'hétérogénéité individuelle il existe une hétérogénéité spatiale importante au sein de coupes de vessie. Ainsi les cellules dont les noyaux apparaissent positifs pour p $H2AX$  apparaissent dans la majorité des cas groupées. Ces « patches » peuvent comporter des cellules de toutes les couches de l'urothélium, notamment dans des zones où il est particulièrement épaissi, suggérant là encore une régénération et une prolifération intense. Notons au passage qu'une exacerbation de la prolifération de l'épithélium des cryptes digestives suite à la colonisation par un *E. coli* producteur de colibactine (Payros et al. 2014), bien que dans le modèle d'infection urinaire nous n'avons pas retrouvé de signes d'apoptose et que ce phénomène d'épaississement ne soit pas restreint aux individus infectés par UTI89 wt. Plusieurs éléments peuvent expliquer ce pattern particulier. D'une part il peut s'agir de cellules filles d'une cellule présentant des dommages à l'ADN. La répartition au sein des différentes couches de l'urothélium associée à une multiplication importante pourrait correspondre à cette filiation. Dans le cadre de la colibactine, il a été montré sur des cultures cellulaires que l'instabilité chromosomique pouvait être transmise aux cellules filles et persistait ainsi à distance de l'infection ce qui pourrait expliquer le phénomène observé (Cuevas-Ramos et al. 2010). Par ailleurs, le phénomène de patches observés pourrait également être lié à un effet « *by-stander* » ou collatéral. Ce type de dommage a été décrit initialement chez des cellules non-irradiées elles-mêmes mais voisines de cellules irradiées et qui présentaient un phénotype

proche de celles irradiées (Little 2003). Il est la conséquence d'une exposition à des communications intercellulaires directes ou à des facteurs relargués dans le milieu extérieur par les cellules endommagées et agissant de manière paracrine. Dans le cadre de la colibactine, les cellules sénescents touchées peuvent produire différents médiateurs (espèces réactives de l'oxygène, cytokines proinflammatoires, chimiokines, protéases...) (Secher et al. 2013; Dalmaso et al. 2014; Cougnoux et al. 2014). Or l'exposition de cellules à ces médiateurs produits dans le milieu de culture sans exposition à la colibactine induit la propagation du phénotype de sénescence et la formation de dommages à l'ADN. Cet effet collatéral pourrait expliquer la distribution des cellules touchées.

D'autre part, la présence de dommages à l'ADN interroge sur l'évolution des cellules impactées. Comme nous l'avons vu en introduction, les conséquences sur les cellules peuvent être variables allant d'une réparation complète à l'apoptose des cellules en passant par la persistance de mutations ou d'instabilité chromosomique ou des phénomènes de sénescence. Dans le cas des infections urinaires, les cellules urothéliales pH2AX positives ne présentent pas de caractéristiques de cellules apoptotiques ce qui suggère leur pérennité mais leur devenir tout comme l'intégrité de leur ADN ne sont actuellement pas connus.

## B) Les infections urinaires à UPEC *pks+*, une cause du cancer de la vessie ?

Suite à ce constat, il semble naturel de s'interroger sur les conséquences à plus long terme de ces dommages à l'ADN notamment en termes de cancer. Cette interrogation est d'autant plus légitime que des cellules progénitrices de l'urothélium Krt14+ sont également touchées. En modèle murin de cancer de la vessie chimiquement induit, plus de la moitié des cas les tumeurs dérivent de cellules Krt14+ (Papafotiou et al. 2016), preuve de leur rôle dans la régénération par exemple lors d'une infection mais également dans le cancer. Chez l'Homme, Krt14 est d'ailleurs un marqueur de mauvais pronostic des cancers de la vessie (Volkmer et al. 2012; Lerner et al. 2016; Yuk et al. 2019). Il est associé à une moins bonne survie et une moindre réponse à certains traitements.

En France le cancer de la vessie est la septième cause de cancer en incidence avec plus de 13000 cas par an et représente la septième cause de décès par cancer (Santé Publique France 2019; Rouprêt et al. 2020). Quatre-vingts pour cent des patients atteints sont des hommes, généralement de plus de 60 ans. Les carcinomes urothéliaux représentent 90% des cas mais il existe des cancers non-urothéliaux comme des carcinomes épidermoïdes (6%). Les principaux facteurs de risque connus sont le tabagisme et l'exposition à des toxiques, notamment d'exposition professionnelle. Ces données expliquent la prédominance masculine. Par ailleurs, dans les zones d'endémie de la

bilharziose liée au parasite *Shistosoma haematobium* (Afrique, Moyen-Orient), l'épidémiologie est différente avec les carcinomes épidermoïdes de la vessie dans les premières causes de cancer et survenant chez des adultes jeunes, toujours avec une prédominance masculine (Saginala et al. 2020). Les mécanismes liant cette infection chronique avec le cancer sont mal connus mais impliqueraient à la fois une réaction inflammatoire chronique au niveau de la vessie où sont enkystés les œufs du parasite au sein de granulomes et un rôle cocarcinogène de *S. haematobium* qui modifierait la réponse immunitaire et la fonction vésicale à long terme (Berry et al. 2017).

L'impact des infections urinaires bactériennes sur les cancers de la vessie a été moins exploré. Néanmoins deux études épidémiologiques récentes apportent de nouveaux éléments en faveur d'un rôle potentiel. Dans la large étude cas-témoin de Nijmegen sur le cancer de la vessie, il est retrouvé une association épidémiologique entre la survenue de plusieurs épisodes d'infections urinaires et le cancer de la vessie (quel que soit le type) ainsi que les infections chez la femme ménopausée (Vermeulen et al. 2015). Une étude nationale rétrospective danoise a montré une large sur-utilisation d'antibiotiques destinés au traitement des infections urinaires chez les patients atteints de cancer épidermoïde de la vessie et non chez les patients atteints de carcinomes urothéliaux (Pottegård et al. 2020). Dans ces études rétrospectives, la documentation microbiologique et *a fortiori* le statut *pks+/-* n'est pas connu. Il existe peu d'études expérimentales mais en modèle rongeur l'infection par *E. coli* semble augmenter les lésions induites par l'administration du précurseur de nitrosamine utilisé comme carcinogène vésical (El-Mosalamy et al. 2012). Historiquement, une des explications avancées est notamment la production de NO et de nitrosamines pouvant être à l'origine de dommages ou de prolifération cellulaire (Hicks et al. 1977; Vermeulen et al. 2015). D'autres études plus récentes incrimineraient la toxine CNF1 des UPEC notamment via son rôle pro-angiogénique (Guo et al. 2020). Les infections urinaires à *E. coli* pourraient avoir également d'autres conséquences à long terme, notamment via des modifications épigénétiques en induisant l'expression d'une des principales méthylases (*de novo* méthyltransférase 1, DNMT1) (Tolg 2011). Dans différentes lignées cellulaires, les UPEC induisent ainsi la répression du gène suppresseur de tumeur *CDKN2A* (Tolg 2011).

Concernant plus spécifiquement la colibactine, nos résultats sont à mettre en parallèle avec les récentes descriptions des signatures mutationnelles de cette génotoxine, essentiellement chez des patients atteints de cancer colorectal mais également dans des cas de cancers des voies urinaires. Ainsi, le profil de mutation caractéristique de la colibactine a été mis en évidence dans plus de 2% des cancers des voies urinaires de patients issus d'une banque de tumeurs métastatiques anglaise (Pleguezuelos-Manzano et al. 2020). Par ailleurs, l'équipe de Meyer et al. a mis en évidence un enrichissement des mutations survenant aux régions AAWTTC ciblés par la colibactine dans les cas

de cancers de la vessie chez des patients avec mutation de l'ADN polymérase  $\epsilon$  (POLE) provenant de la collection The Cancer Genome Atlas (Dziubańska-Kusibab et al. 2020). De manière intéressante, cette polymérase est particulièrement impliquée dans la correction de la synthèse de l'ADN grâce à une activité exonucléase correctrice et donc la protection contre l'instabilité génomique (Henninger and Pursell 2014). Ces données indépendantes impliquent ainsi le rôle potentiel de la colibactine dans une partie des cancers des voies urinaires.

Il nous semble ainsi nécessaire à l'avenir d'explorer plus en détails la contribution de la colibactine à ce type de cancers par des études complémentaires. En particulier, l'utilisation de modèles expérimentaux de cancers de la vessie permettrait d'explorer les conséquences d'une infection par une UPEC *pks+* versus un mutant isogénique non génotoxique dans un système contrôlé. Ces modèles animaux utilisent généralement l'administration de composés chimiques carcinogènes vésicaux tels que des dérivés des nitrosamines (N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine, BBN), proche des composés toxiques associés au tabagisme (Kobayashi et al. 2015). On pourrait ainsi tester la potentialisation de l'activité carcinogène par une infection urinaire concomitante, notamment avec une colonisation chronique ou des infections récurrentes. De plus il ne faut pas perdre de vue que, comme tout cancer celui de la vessie est également multifactoriel, et que tester la synergie de différents facteurs environnementaux de l'exposome auxquels l'être humain est soumis, dont les infections urinaires, peut être informatif. Il pourrait ainsi être judicieux de s'intéresser aux conséquences d'une co-exposition infection urinaire à UPEC *pks+* avec la mycotoxine déoxynivalénol (DON) dont il a été montré qu'elle exacerbe les dommages à l'ADN liés à la colibactine lors d'une colonisation digestive (Payros et al. 2017).

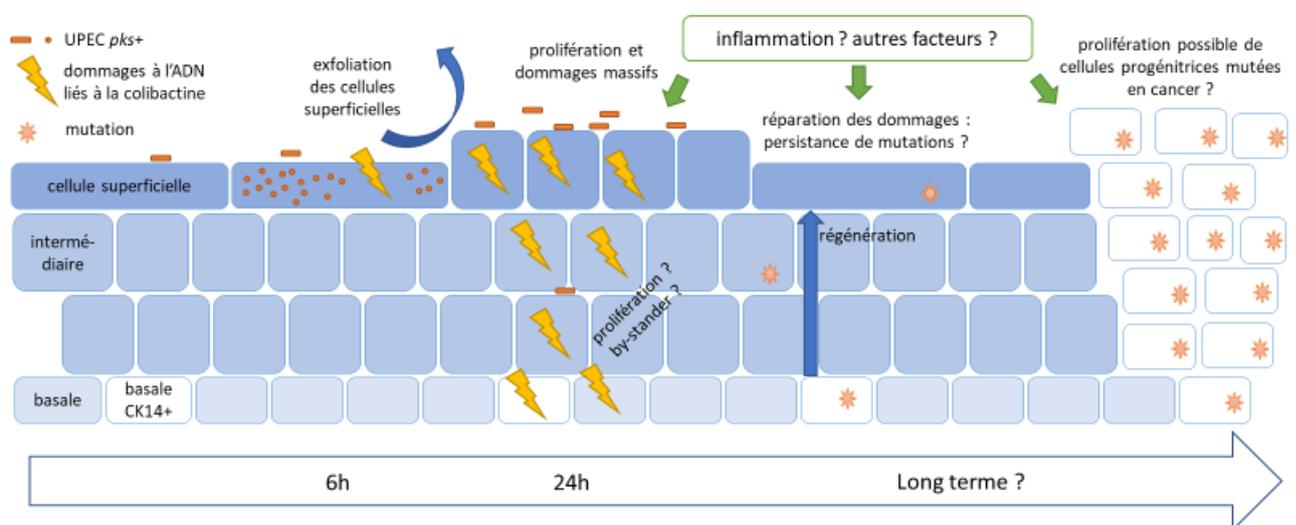


Figure 26 : Quelles sont les conséquences des dommages à l'ADN des UPEC *pks+* ? Précocement au cours de l'infection urinaire, ils induisent des dommages à l'ADN des cellules superficielles contenant des IBC. A 24h après l'infection de nombreuses cellules contiguës présentent un noyau positif pour  $\gamma$ H2AX, y compris basales, sans qu'on ne connaisse le

*mécanisme de propagation. Le nombre de cellules pH2AX positives diminue fortement les jours suivants lors de la régénération mais il pourrait subsister des mutations, notamment dans les cellules progénitrices de la vessie, ce qui pourrait conduire à l'apparition de lésions cancéreuses. La place de d'autres facteurs tels que l'inflammation ou d'autres composés génotoxiques ou synergiques reste à investiguer. Voir le texte pour les détails.*

Enfin, s'il s'avère que la colibactine favorise le développement du cancer de la vessie, il faudra alors regarder d'un œil particulier les bactériuries asymptomatiques. En effet, dans notre collection 20/37 souches issues de bactériuries asymptomatiques sont porteuses de l'îlot *pks*, soit plus de 50%. Ces souches sont bien génotoxiques *in vitro*. Dans les urines de ces patients comme dans celles de patients atteints de cystites ou pyélonéphrites du C14-Asn est retrouvé, reflet de l'expression de la colibactine chez ces patients asymptomatiques. Or les bactériuries asymptomatiques ne sont généralement pas traitées par antibiotiques, sauf en cas de grossesse ou d'acte urologique invasif (SPILF 2015). Elles peuvent ainsi persister de manière silencieuse des semaines, des mois, voire des années. C'est le cas de la souche archétypale *E. coli* ABU83972 retrouvée sur une période de 3 ans (Lindberg et al. 1975). Notons au passage que ABU83972 possède l'îlot *pks* et possède une activité génotoxique liée à la colibactine (données non publiée). Malgré cette activité potentiellement délétère, son utilisation comme « probiotique » des voies urinaires pour prévenir par compétition la survenue d'infections symptomatiques a été proposée (Wullt and Svanborg 2016). Toujours est-il que dans cette hypothèse, il pourrait sembler bénéfique de dépister les bactériuries asymptomatiques chez certains patients plus à risque de cancer de la vessie et de rechercher la présence ou non de l'îlot *pks* si un ECBU est positif à *E. coli*. Cependant, cela pose ensuite la question de la prise en charge à proposer à ces patients. Est-il raisonnable, à l'heure où l'antibiorésistance est en passe de devenir une des premières causes de mortalité dans les années à venir, de les traiter par antibiotiques sans assurance d'un bénéfice vis-à-vis du risque d'un cancer où d'autres facteurs comme le tabagisme jouent un rôle prépondérant ? L'intérêt pourrait être dans ce cas des traitements ciblés antivirulence diminuant la synthèse de la colibactine tout en limitant la pression de sélection sur le microbiote (Cougnoux et al. 2016; Tang-Fichaux et al. 2020).

### III) Perspectives

Dans le cadre de ce travail et à l'issue de cette discussion, il me semble important de mettre en exergue trois grandes pistes d'évolution du projet et de questionnement futur.

Premièrement la nécessité d'avoir recours à d'autres modèles pour poursuivre l'exploration des conséquences de l'îlot *pks* durant l'infection urinaire. Ainsi des modèles murins favorisant la chronicité ou reproduisant des infections récurrentes pourraient être utilisés. De même le recours à

des modèles de cancer de la vessie reposant généralement sur l'utilisation de toxiques nitrosaminés pro-carcinogènes pourrait favoriser l'étude de l'impact d'infections à *E. coli* produisant la colibactine, y compris en association avec d'autres facteurs (Kobayashi et al. 2015). En parallèle il serait intéressant de mieux connaître les caractéristiques des cancers des patients ayant un cancer des voies urinaires et chez lesquels la signature mutationnelle de la colibactine a été retrouvée pour mieux cibler le type de modèle à utiliser. Par ailleurs, des organoïdes de vessie humains sont actuellement en cours de développement, notamment en partenariat avec notre Institut. Une mise au point sera nécessaire mais leur emploi comme nouveau modèle utilisant des tissus humains pour tester l'impact des métabolites de l'îlot *pks* est séduisant.

Ce travail est également l'occasion de considérer ou reconsidérer la place de certains facteurs de virulence dans la physiopathologie des infections urinaires. Ainsi l'îlot *pks* et ses différents et divers métabolites méritent d'être explorés plus en détails, y compris dans d'autres modèles explorant plus précisément la douleur, la chronicité et la persistance, les communautés bactériennes... Par ailleurs, la constitution d'une large collection d'UPEC entièrement séquencée est également un moyen de se pencher sur d'autres facteurs peu étudiés dans le cadre des infections urinaires. C'est ainsi que j'ai initié une étude sur l'hémolysine F, une toxine bactérienne non pas hémolytique en elle-même mais impliquée dans une hyperproduction de vésicules extra-cellulaires qui perturbent l'autophagie. Elle était jusque-là traditionnellement associée aux *E. coli* issus de colibacillose aviaire ou méningite néonatale mais l'étude de la collection constituée a pu montrer sa présence chez les UPEC notamment issus d'infections urinaires sévères.

Enfin les enjeux principaux du champ de la recherche sur les infections urinaires sont peut-être encore ailleurs. En effet combien de fois n'ai-je pas entendu la rengaine au cours de ces dernières années : « Ah tu travailles sur les infections urinaires !? j'en ai très souvent, ça me gêne un peu la vie... et tu as trouvé un moyen pour les éviter ? ». Bien qu'elles soient généralement bénignes, ce sont en effet ces infections volontiers récurrentes qui sont source de douleur, d'inconfort et d'anxiété au quotidien pour de nombreuses femmes. Différentes équipes travaillent sur le sujet, en particulier à déterminer le rôle et le moyen de contrôler les différents réservoirs comme le tractus digestif (Spaulding et al. 2017) ou la vessie elle-même avec la réactivation de QIR pouvant jouer un rôle dans les récurrences (De Nisco et al. 2019). Cependant ces infections récurrentes restent difficiles à reproduire à l'identique en modèle animal. La réponse de l'hôte, notamment à l'infection initiale, semblerait également jouer un rôle puisqu'une réponse trop sévère favorise les récurrences (Hannan et al. 2010; O'Brien et al. 2017). Il pourrait ainsi être intéressant de réfléchir dans la prise en charge non pas uniquement à des antimicrobiens mais également à des stratégies limitant les réservoirs des uropathogènes ou modulant la réponse de l'hôte (douleur, réponse inflammatoire).

#### IV) Conclusion générale

Durant ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la place et aux rôles et conséquences de l'îlot *pks* dans les infections urinaires, ce qui avait été jusque-là peu exploré dans ce contexte.

Notre travail a ainsi permis de décrire l'épidémiologie de cet îlot de pathogénicité dans ce type d'infection. D'une part il est ainsi fortement associé à l'îlot microcine tronqué et au locus *iro* avec lesquels il agit en synergie pour produire des sidérophores-microcines à activité anti-microbienne. D'autre part sa présence n'est pas associée à la sévérité de l'infection urinaire, il ne semble donc pas être un facteur de virulence d'un point de vue épidémiologique. Ces résultats suggèrent que l'îlot *pks* serait ainsi plus un facteur de colonisation (notamment du réservoir digestif) que de virulence urinaire.

Ensuite, nous avons exploré les conséquences de la présence de l'îlot *pks* durant une infection urinaire. Nous avons ainsi montré la présence d'un métabolite issu de la machinerie *pks* pour la première fois dans des urines de patients atteints d'infections urinaires, signant l'activation de la machinerie *pks*. En modèle murin, l'infection urinaire par un UPEC *pks+* entraîne des dommages à l'ADN en lien avec la production de la génotoxine colibactine. La présence de ces dommages, y compris dans des cellules progénitrices de la vessie, pourrait induire des conséquences à plus long-terme qu'il faudra investiguer, notamment en termes de cancer de la vessie.

# Bibliographie

- Abraham, S.N., and Miao, Y. 2015. The nature of immune responses to urinary tract infections. *Nat. Rev. Immunol.* **15**(10): 655–663. doi:10.1038/nri3887.
- Ackerman, A.L., and Chai, T.C. 2019. The Bladder is Not Sterile: an Update on the Urinary Microbiome. *Curr. Bladder Dysfunct. Rep.* **14**(4): 331–341. doi:10.1007/s11884-019-00543-6.
- Amoutzias, G.D., Chaliotis, A., and Mossialos, D. 2016. Discovery strategies of bioactive compounds synthesized by nonribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases derived from marine microbiomes. *Mar. Drugs* **14**(4). doi:10.3390/md14040080.
- Anderson, G.G., Palermo, J.J., Schilling, J.D., Roth, R., Heuser, J., and Hultgren, S.J. 2003. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* **301**(5629): 105–107. doi:10.1126/science.1084550.
- Aprikian, P., Interlandi, G., Kidd, B.A., Trong, I.L., Tchesnokova, V., Yakovenko, O., Whitfield, M.J., Bullitt, E., Stenkamp, R.E., Thomas, W.E., and Sokurenko, E.V. 2011. The Bacterial Fimbrial Tip Acts as a Mechanical Force Sensor. *PLOS Biol.* **9**(5): e1000617. Public Library of Science. doi:10.1371/journal.pbio.1000617.
- Arthur, J.C., Gharaibeh, R.Z., Mühlbauer, M., Perez-Chanona, E., Uronis, J.M., McCafferty, J., Fodor, A.A., and Jobin, C. 2014. Microbial genomic analysis reveals the essential role of inflammation in bacteria-induced colorectal cancer. *Nat. Commun.* **5**: 4724. doi:10.1038/ncomms5724.
- Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.-J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B., Rhodes, J.M., Stintzi, A., Simpson, K.W., Hansen, J.J., Keku, T.O., Fodor, A.A., and Jobin, C. 2012. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* **338**(6103): 120–123. doi:10.1126/science.1224820.
- Augé, C., Chene, G., Dubourdeau, M., Desoubzdanne, D., Corman, B., Palea, S., Lluel, P., Vergnolle, N., and Coelho, A.-M. 2013. Relevance of the cyclophosphamide-induced cystitis model for pharmacological studies targeting inflammation and pain of the bladder. *Eur. J. Pharmacol.* **707**(1): 32–40. doi:10.1016/j.ejphar.2013.03.008.
- Auvray, F., Perrat, A., Arimizu, Y., Chagneau, C.V., Bossuet-Greif, N., Massip, C., Brugère, H., Nougayrède, J.-P., Hayashi, T., Branchu, P., Ogura, Y., and Oswald, E. 2021. Insights into the acquisition of the pks island and production of colibactin in the *Escherichia coli* population. *Microb. Genomics* **7**(5). doi:10.1099/mgen.0.000579.
- Avendaño, C., and Menéndez, J.C. 2015. Chapter 4 - Anticancer Drugs Acting via Radical Species: Radiotherapy and Photodynamic Therapy of Cancer. *In Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs (Second Edition)*. Edited by C. Avendaño and J.C. Menéndez. Elsevier, Boston. pp. 133–195. doi:10.1016/B978-0-444-62649-3.00004-1.
- Bauer, R.J., Zhang, L., Foxman, B., Siitonen, A., Jantunen, M.E., Saxen, H., and Marrs, C.F. 2002. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-*usp*, *iha*, and *iroN*(*E. coli*). *J. Infect. Dis.* **185**(10): 1521–1524. doi:10.1086/340206.
- Belluz, L.D.B., Guidi, R., Pateras, I.S., Levi, L., Mihaljevic, B., Rouf, S.F., Wrande, M., Candela, M., Turroni, S., Nastasi, C., Consolandi, C., Peano, C., Tebaldi, T., Viero, G., Gorgoulis, V.G., Krejsgaard, T., Rhen, M., and Frisan, T. 2016. The Typhoid Toxin Promotes Host Survival and the Establishment of a Persistent Asymptomatic Infection. *PLOS Pathog.* **12**(4): e1005528. Public Library of Science. doi:10.1371/journal.ppat.1005528.
- Berry, A., Iriart, X., Fillaux, J., and Magnaval, J.-F. 2017. Schistosomose urogénitale et cancer. *Bull. Société Pathol. Exot.* **110**(1): 68–75. doi:10.1007/s13149-017-0547-4.
- Bian, X., Fu, J., Plaza, A., Herrmann, J., Pistorius, D., Stewart, A.F., Zhang, Y., and Müller, R. 2013. In Vivo Evidence for a Prodrug Activation Mechanism during Colibactin Maturation. *ChemBioChem* **14**(10): 1194–1197. doi:10.1002/cbic.201300208.
- Birder, L.A., and Klumpp, D.J. 2016. Host Responses to Urinary Tract Infections and Emerging Therapeutics: Sensation and Pain within the Urinary Tract. *Microbiol. Spectr.* **4**(5). doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0023-2016.
- Birgy, A., Madhi, F., Jung, C., Levy, C., Cointe, A., Bidet, P., Hobson, C.A., Bechet, S., Sobral, E., Vuthien, H., Ferroni, A., Aberrane, S., Cuzon, G., Beraud, L., Gajdos, V., Launay, E., Pinquier,

- D., Haas, H., Desmarest, M., Dommergues, M.-A., Cohen, R., Bonacorsi, S., Adam, M.-N., Amara, M., Andriantahina, I., Belgaid, A., Biscardi, S., Boyer, S., Branger, C., Breant, I., Breuil, J., Caillon, J., Cixous, E., Cojocar, B., Craiu, I., Decobert, M., Dessein, R., Doucet-Populaire, F., Dubos, F., Ducrocq, S., Farges-Berth, A., Farrugia, C., Fiacre, A., Galerne, A., Garrec, H., Georget, E., Grimpel, E., Hees, L., Labbee, F., Pitsch, A., Poilane, I., Sivadon-Tardy, V., Soussan-Banini, V., Starck, B., Timsit, S., Traore, P., Vachee, A., and Vignaud, O. 2020. Diversity and trends in population structure of ESBL-producing Enterobacteriaceae in febrile urinary tract infections in children in France from 2014 to 2017. *J. Antimicrob. Chemother.* **75**(1): 96–105. Oxford Academic. doi:10.1093/jac/dkz423.
- Bishop, B.L., Duncan, M.J., Song, J., Li, G., Zaas, D., and Abraham, S.N. 2007. Cyclic AMP-regulated exocytosis of *Escherichia coli* from infected bladder epithelial cells. *Nat. Med.* **13**(5): 625–630. doi:10.1038/nm1572.
- Bjorling, D.E., Wang, Z.-Y., Boldon, K., and Bushman, W. 2008. Bacterial Cystitis is Accompanied by Increased Peripheral Thermal Sensitivity in Mice. *J. Urol.* **179**(2): 759–763. doi:10.1016/j.juro.2007.09.024.
- Blango, M.G., Ott, E.M., Erman, A., Veranic, P., and Mulvey, M.A. 2014. Forced Resurgence and Targeting of Intracellular Uropathogenic *Escherichia coli* Reservoirs. *PLoS ONE* **9**(3). doi:10.1371/journal.pone.0093327.
- Bondarev, V., Richter, M., Romano, S., Piel, J., Schwedt, A., and Schulz-Vogt, H.N. 2013. The genus *Pseudovibrio* contains metabolically versatile bacteria adapted for symbiosis. *Environ. Microbiol.* **15**(7): 2095–2113. doi:10.1111/1462-2920.12123.
- Bossuet-Greif, N., Dubois, D., Petit, C., Tronnet, S., Martin, P., Bonnet, R., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. 2016. *Escherichia coli* ClbS is a colibactin resistance protein. *Mol. Microbiol.* **99**(5): 897–908. doi:10.1111/mmi.13272.
- Bossuet-Greif, N., Vignard, J., Taieb, F., Mirey, G., Dubois, D., Petit, C., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. 2018. The colibactin genotoxin generates DNA interstrand cross-links in infected cells. *mBio* **9**(2): e02393-17. doi:10.1128/mBio.02393-17.
- Boyer, L., and Lemichez, E. 2015. Switching Rho GTPase activation into effective antibacterial defenses requires the caspase-1/IL-1 $\beta$  signaling axis. *Small GTPases* **6**(4): 186–188. Taylor & Francis. doi:10.1080/21541248.2015.1095698.
- Brachmann, A.O., Garcie, C., Wu, V., Martin, P., Ueoka, R., Oswald, E., and Piel, J. 2015. Colibactin biosynthesis and biological activity depend on the rare aminomalonyl polyketide precursor. *Chem Commun* **51**(66): 13138–13141. doi:10.1039/C5CC02718G.
- Brannon, J.R., Dunigan, T.L., Beebout, C.J., Ross, T., Wiebe, M.A., Reynolds, W.S., and Hadjifrangiskou, M. 2020. Invasion of vaginal epithelial cells by uropathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Commun.* **11**(1): 2803. doi:10.1038/s41467-020-16627-5.
- Britt, R.C., Devine, A., Swallen, K.C., Weireter, L.J., Collins, J.N., Cole, F.J., and Britt, L.D. 2006. Corticosteroid use in the intensive care unit: at what cost? *Arch. Surg. Chic. Ill* 1960 **141**(2): 145–149; discussion 149. doi:10.1001/archsurg.141.2.145.
- Brotherton, C.A., and Balskus, E.P. 2013. A prodrug resistance mechanism is involved in colibactin biosynthesis and cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* **135**(9): 3359–3362. doi:10.1021/ja312154m.
- Brotherton, C.A., Wilson, M., Byrd, G., and Balskus, E.P. 2015. Isolation of a Metabolite from the pks Island Provides Insights into Colibactin Biosynthesis and Activity. *Org. Lett.* **17**(6): 1545–1548. doi:10.1021/acs.orglett.5b00432.
- Bruyère, F., Cariou, G., Boiteux, J.-P., Hoznek, A., Mignard, J.-P., Escaravage, L., Bernard, L., and Sotto, A. 2008a. Prostatites aiguës Acute prostatitis. *Prog. En Urol.* **18**(1): S19–S23.
- Bruyère, F., Cariou, G., Boiteux, J.-P., Hoznek, A., Mignard, J.-P., Escaravage, L., Bernard, L., Sotto, A., Soussy, C.-J., and Coloby, P. 2008b. Cystites aiguës. *Prog. En Urol.* **18**: 9–13.
- Bruyère, F., Cariou, G., Boiteux, J.-P., Hoznek, A., Mignard, J.-P., Escaravage, L., Bernard, L., Sotto, A., Soussy, C.-J., and Coloby, P. 2008c. Pyélonéphrites aiguës. *Prog. En Urol.* **18**: 14–18.

- Buc, E., Dubois, D., Sauvanet, P., Raisch, J., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., Pezet, D., and Bonnet, R. 2013. High prevalence of mucosa-associated *E. coli* producing cyclomodulin and genotoxin in colon cancer. *PloS One* **8**(2): e56964. doi:10.1371/journal.pone.0056964.
- Cai, T., Mazzoli, S., Mondaini, N., Meacci, F., Nesi, G., D'Elia, C., Malossini, G., Boddi, V., and Bartoletti, R. 2012. The Role of Asymptomatic Bacteriuria in Young Women With Recurrent Urinary Tract Infections: To Treat or Not to Treat? *Clin. Infect. Dis.* **55**(6): 771–777. doi:10.1093/cid/cis534.
- Capett, M.S., Vollú-Silva, P., Melchades, V.A., Bokehi, L.C., Araújo, F.M., Martins, I.S., Neves, F.P.G., Gonzalez, A.G.M., Oswald, E., de Paula, G.R., and Teixeira, L.A. 2016. Characterization of Ciprofloxacin-Resistant and Ciprofloxacin-Susceptible Uropathogenic *Escherichia coli* Obtained from Patients with Gynecological Cancer. *Curr. Microbiol.* **73**(5): 624–632. doi:10.1007/s00284-016-1104-y.
- Carlson, E.S., and Balskus, E.P. 2019. The mysteries of macrocyclic colibactins. *Nat. Chem.* **11**(10): 867–869. doi:10.1038/s41557-019-0339-1.
- Caron, F., Galperine, T., Flateau, C., Azria, R., Bonacorsi, S., Bruyère, F., Cariou, G., Clouqueur, E., Cohen, R., Doco-Lecompte, T., Elefant, E., Faure, K., Gauzit, R., Gavazzi, G., Lemaitre, L., Raymond, J., Senneville, E., Sotto, A., Subtil, D., Trivalle, C., Merens, A., and Etienne, M. 2018. Practice guidelines for the management of adult community-acquired urinary tract infections. *Médecine Mal. Infect.* **48**(5): 327–358. doi:10.1016/j.medmal.2018.03.005.
- Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). 2019. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). doi:10.15620/cdc:82532.
- Cevallos, S.A., Lee, J.-Y., Tiffany, C.R., Byndloss, A.J., Johnston, L., Byndloss, M.X., and Bäumlér, A.J. 2019. Increased Epithelial Oxygenation Links Colitis to an Expansion of Tumorigenic Bacteria. *mBio* **10**(5): e02244-19. doi:10.1128/mBio.02244-19.
- Chagneau, C.V., Garcie, C., Bossuet-Greif, N., Tronnet, S., Brachmann, A.O., Piel, J., Nougayrède, J.-P., Martin, P., and Oswald, E. 2019. The Polyamine Spermidine Modulates the Production of the Bacterial Genotoxin Colibactin. *mSphere* **4**(5): e00414-19. doi:10.1128/mSphere.00414-19.
- Chagneau, C.V., Massip, C., Bossuet-Greif, N., Fremez, C., Motta, J.-P., Shima, A., Besson, C., Faouder, P.L., Cénac, N., Roth, M.-P., Coppin, H., Fontanié, M., Martin, P., Nougayrède, J.-P., and Oswald, E. 2021. Uropathogenic *E. coli* induces DNA damage in the bladder. *PLOS Pathog.* **17**(2): e1009310. Public Library of Science. doi:10.1371/journal.ppat.1009310.
- Chan, C.Y., St John, A.L., and Abraham, S.N. 2013. Mast cell interleukin-10 drives localized tolerance in chronic bladder infection. *Immunity* **38**(2): 349–359. doi:10.1016/j.immuni.2012.10.019.
- Chen, S.L., Wu, M., Henderson, J.P., Hooton, T.M., Hibbing, M.E., Hultgren, S.J., and Gordon, J.I. 2013. Genomic Diversity and Fitness of *E. coli* Strains Recovered from the Intestinal and Urinary Tracts of Women with Recurrent Urinary Tract Infection. *Sci. Transl. Med.* **5**(184): 184ra60-184ra60. doi:10.1126/scitranslmed.3005497.
- Ching, C., Schwartz, L., Spencer, J.D., and Becknell, B. 2020. Innate immunity and urinary tract infection. *Pediatr. Nephrol.* **35**(7): 1183–1192. doi:10.1007/s00467-019-04269-9.
- Choi, H.W., Bowen, S.E., Miao, Y., Chan, C.Y., Miao, E.A., Abrink, M., Moeser, A.J., and Abraham, S.N. 2016. Loss of Bladder Epithelium Induced by Cytolytic Mast Cell Granules. *Immunity* **45**(6): 1258–1269. doi:10.1016/j.immuni.2016.11.003.
- Chromek, M., Slamová, Z., Bergman, P., Kovács, L., Podracká, L., Ehrén, I., Hökfelt, T., Gudmundsson, G.H., Gallo, R.L., Agerberth, B., and Brauner, A. 2006. The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nat. Med.* **12**(6): 636–641. doi:10.1038/nm1407.
- Chuang, P., Parikh, C.R., and Langone, A. 2005. Urinary tract infections after renal transplantation: a retrospective review at two US transplant centers. *Clin. Transplant.* **19**(2): 230–235. doi:10.1111/j.1399-0012.2005.00327.x.
- 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**(1): 58–65. doi:10.1111/1758-2229.12019.

- Clermont, O., Dixit, O.V.A., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., Denamur, E., and Gordon, D. 2019. Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environ. Microbiol.* **21**(8): 3107–3117. doi:10.1111/1462-2920.14713.
- Colgan, R., Nicolle, L.E., McGlone, A., and Hooton, T.M. 2006. Asymptomatic bacteriuria in adults. *Am. Fam. Physician* **74**(6).
- Conover, M.S., Ruer, S., Taganna, J., Kalas, V., De Greve, H., Pinkner, J.S., Dodson, K.W., Remaut, H., and Hultgren, S.J. 2016. Inflammation-induced adhesin-receptor interaction provides a fitness advantage to uropathogenic *E. coli* during chronic infection. *Cell Host Microbe* **20**(4): 482–492. doi:10.1016/j.chom.2016.08.013.
- Cougnoux, A., Dalmasso, G., Martinez, R., Buc, E., Delmas, J., Gibold, L., Sauvanet, P., Darcha, C., Déchelotte, P., Bonnet, M., Pezet, D., Wodrich, H., Darfeuille-Michaud, A., and Bonnet, R. 2014. Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut* **63**(12): 1932–1942. doi:10.1136/gutjnl-2013-305257.
- Cougnoux, A., Delmas, J., Gibold, L., Faïs, T., Romagnoli, C., Robin, F., Cuevas-Ramos, G., Oswald, E., Darfeuille-Michaud, A., Prati, F., Dalmasso, G., and Bonnet, R. 2016. Small-molecule inhibitors prevent the genotoxic and protumoural effects induced by colibactin-producing bacteria. *Gut* **65**(2): 278–285. doi:10.1136/gutjnl-2014-307241.
- Cougnoux, A., Gibold, L., Robin, F., Dubois, D., Pradel, N., Darfeuille-Michaud, A., Dalmasso, G., Delmas, J., and Bonnet, R. 2012. Analysis of structure-function relationships in the colibactin-maturating enzyme ClbP. *J. Mol. Biol.* **424**(3–4): 203–214. doi:10.1016/j.jmb.2012.09.017.
- Črnigoj, M., Podlesek, Z., Budič, M., and Žgur-Bertok, D. 2014. The *Escherichia coli* uropathogenic-specific-protein-associated immunity protein 3 (Imu3) has nucleic acid-binding activity. *BMC Microbiol.* **14**(1): 16. doi:10.1186/1471-2180-14-16.
- Crock, L.W., Stemler, K.M., Song, D.G., Abbosh, P., Vogt, S.K., Qiu, C.-S., Lai, H.H., Mysorekar, I.U., and Gereau IV, R.W. 2012. Metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) regulates bladder nociception. *Mol. Pain* **8**(20): 1–13. doi:10.1186/1744-8069-8-20.
- Croxen, M.A., and Finlay, B.B. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**(1): 26–38. doi:10.1038/nrmicro2265.
- Cuevas-Ramos, G., Petit, C.R., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. 2010. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**(25): 11537–11542. doi:10.1073/pnas.1001261107.
- Dalghi, M.G., Montalbetti, N., Carattino, M.D., and Apodaca, G. 2020. The Urothelium: Life in a Liquid Environment. *Physiol. Rev.* **100**(4): 1621–1705. doi:10.1152/physrev.00041.2019.
- Dalmasso, G., Cougnoux, A., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., and Bonnet, R. 2014. The bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by modifying the tumor microenvironment. *Gut Microbes* **5**(5): 675–680. doi:10.4161/19490976.2014.969989.
- Darouiche, R.O., Donovan, W.H., Del Terzo, M., Thornby, J.I., Rudy, D.C., and Hull, R.A. 2001. Pilot trial of bacterial interference for preventing urinary tract infection. *Urology* **58**(3): 339–344. doi:10.1016/s0090-4295(01)01271-7.
- Darouiche, R.O., Thornby, J.I., Cerra-Stewart, C., Donovan, W.H., and Hull, R.A. 2005. Bacterial interference for prevention of urinary tract infection: a prospective, randomized, placebo-controlled, double-blind pilot trial. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **41**(10): 1531–1534. doi:10.1086/497272.
- De Nisco, N.J., Neugent, M., Mull, J., Chen, L., Kuprasertkul, A., de Souza Santos, M., Palmer, K.L., Zimmern, P., and Orth, K. 2019. Direct Detection of Tissue-Resident Bacteria and Chronic Inflammation in the Bladder Wall of Postmenopausal Women with Recurrent Urinary Tract Infection. *J. Mol. Biol.* **431**(21): 4368–4379. doi:10.1016/j.jmb.2019.04.008.
- Defez, C., Fabbro-Peray, P., Cazaban, M., Boudemaghe, T., Sotto, A., and Daurès, J.P. 2008. Additional direct medical costs of nosocomial infections: an estimation from a cohort of patients in a French university hospital. *J. Hosp. Infect.* **68**(2): 130–136. doi:10.1016/j.jhin.2007.11.005.

- Dejea, C.M., Fathi, P., Craig, J.M., Boleij, A., Taddese, R., Geis, A.L., Wu, X., DeStefano Shields, C.E., Hechenbleikner, E.M., Huso, D.L., Anders, R.A., Giardiello, F.M., Wick, E.C., Wang, H., Wu, S., Pardoll, D.M., Housseau, F., and Sears, C.L. 2018. Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science* **359**(6375): 592–597. doi:10.1126/science.aah3648.
- Denamur, E., Bonacorsi, S., Giraud, A., Duriez, P., Hilali, F., Amorin, C., Bingen, E., Andreumont, A., Picard, B., Taddei, F., and Matic, I. 2002. High Frequency of Mutator Strains among Human Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates. *J. Bacteriol.* **184**(2): 605–609. American Society for Microbiology. doi:10.1128/JB.184.2.605-609.2002.
- Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., and Gordon, D. 2021. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**(1): 37–54. doi:10.1038/s41579-020-0416-x.
- Dhakal, B.K., and Mulvey, M.A. 2012. The UPEC Pore Forming Toxin  $\alpha$ -Hemolysin Triggers Proteolysis of Host Proteins to Disrupt Cell Adhesion, Inflammatory and Survival Pathways. *Cell Host Microbe* **11**(1): 58. doi:10.1016/j.chom.2011.12.003.
- Diabate, M., Munro, P., Garcia, E., Jacquelin, A., Michel, G., Obba, S., Goncalves, D., Luci, C., Marchetti, S., Demon, D., Degos, C., Bechah, Y., Mege, J.-L., Lamkanfi, M., Auberger, P., Gorvel, J.-P., Stuart, L.M., Landraud, L., Lemichez, E., and Boyer, L. 2015. *Escherichia coli*  $\alpha$ -Hemolysin Counteracts the Anti-Virulence Innate Immune Response Triggered by the Rho GTPase Activating Toxin CNF1 during Bacteremia. *PLOS Pathog.* **11**(3): e1004732. doi:10.1371/journal.ppat.1004732.
- Dikshit, N., Bist, P., Fenlon, S.N., Pulloor, N.K., Chua, C.E.L., Scidmore, M.A., Carlyon, J.A., Tang, B.L., Chen, S.L., and Sukumaran, B. 2015. Intracellular Uropathogenic *E. coli* Exploits Host Rab35 for Iron Acquisition and Survival within Urinary Bladder Cells. *PLoS Pathog.* **11**(8): e1005083. doi:10.1371/journal.ppat.1005083.
- DiRienzo, J.M. 2014. Uptake and Processing of the Cytolethal Distending Toxin by Mammalian Cells. *Toxins* **6**(11): 3098–3116. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. doi:10.3390/toxins6113098.
- Dobrindt, U., Wullt, B., and Svanborg, C. 2016. Asymptomatic Bacteriuria as a Model to Study the Coevolution of Hosts and Bacteria. *Pathog. Basel Switz.* **5**(1). doi:10.3390/pathogens5010021.
- Doye, A., Mettouchi, A., Bossis, G., Clément, R., Buisson-Touati, C., Flatau, G., Gagnoux, L., Piechaczyk, M., Boquet, P., and Lemichez, E. 2002. CNF1 Exploits the Ubiquitin-Proteasome Machinery to Restrict Rho GTPase Activation for Bacterial Host Cell Invasion. *Cell* **111**(4): 553–564. doi:10.1016/S0092-8674(02)01132-7.
- Dubois, D., Baron, O., Cougnoux, A., Delmas, J., Pradel, N., Boury, M., Bouchon, B., Bringer, M.-A., Nougayrède, J.-P., Oswald, E., and Bonnet, R. 2011. ClbP Is a prototype of a peptidase subgroup involved in biosynthesis of nonribosomal peptides. *J. Biol. Chem.* **286**(41): 35562–35570. doi:10.1074/jbc.M111.221960.
- Dubois, D., Delmas, J., Cady, A., Robin, F., Sivignon, A., Oswald, E., and Bonnet, R. 2010. Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **48**(6): 2122–2129. doi:10.1128/JCM.02365-09.
- Dufies, O., Doye, A., Courjon, J., Torre, C., Michel, G., Loubatier, C., Jacquelin, A., Chaintreuil, P., Majoor, A., Guinamard, R.R., Gallerand, A., Saavedra, P.H.V., Verhoeyen, E., Rey, A., Marchetti, S., Ruimy, R., Czerucka, D., Lamkanfi, M., Py, B.F., Munro, P., Visvikis, O., and Boyer, L. 2021. *Escherichia coli* Rho GTPase-activating toxin CNF1 mediates NLRP3 inflammasome activation via p21-activated kinases-1/2 during bacteraemia in mice. *Nat. Microbiol.* **6**(3): 401–412. doi:10.1038/s41564-020-00832-5.
- Duprilot, M., Baron, A., Blanquart, F., Dion, S., Pouget, C., Lettéron, P., Flament-Simon, S.-C., Clermont, O., Denamur, E., and Nicolas-Chanoine, M.-H. 2020. Success of *Escherichia coli* O25b:H4 Sequence Type 131 Clade C Associated with a Decrease in Virulence. *Infect. Immun.* **88**(12). American Society for Microbiology Journals. doi:10.1128/IAI.00576-20.

- Dziubańska-Kusibab, P.J., Berger, H., Battistini, F., Bouwman, B.A.M., Iftekhhar, A., Katainen, R., Cajuso, T., Crosetto, N., Orozco, M., Aaltonen, L.A., and Meyer, T.F. 2020. Colibactin DNA-damage signature indicates mutational impact in colorectal cancer. *Nat. Med.*: 1–7. Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41591-020-0908-2.
- Eklöf, V., Löfgren-Burström, A., Zingmark, C., Edin, S., Larsson, P., Karling, P., Alexeyev, O., Rutegård, J., Wikberg, M.L., and Palmqvist, R. 2017. Cancer-associated fecal microbial markers in colorectal cancer detection. *Int. J. Cancer* **141**(12): 2528–2536. doi:https://doi.org/10.1002/ijc.31011.
- Elkharrat, D., Arrouy, L., Benhamou, F., Dray, A., Grenet, J., and Corre, A.L. 2007. Épidémiologie de l’infection urinaire communautaire de l’adulte en France. *In* Les infections urinaires. *Edited by* B. Lobel and C.-J. Soussy. Springer Paris, Paris. pp. 1–20. doi:10.1007/978-2-287-48617-3\_1.
- El-Mosalamy, H., Salman, T.M., Ashmawey, A.M., and Osama, N. 2012. Role of chronic *E. coli* infection in the process of bladder cancer- an experimental study. *Infect. Agent. Cancer* **7**(1): 19. doi:10.1186/1750-9378-7-19.
- Engel, P., Vizcaino, M.I., and Crawford, J.M. 2015. Gut symbionts from distinct hosts exhibit genotoxic activity via divergent colibactin biosynthesis pathways. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**(4): 1502–1512. doi:10.1128/AEM.03283-14.
- Er, D.K., Dundar, D., Uzuner, H., and Osmani, A. 2015. Relationship between phylogenetic groups, antibiotic resistance and patient characteristics in terms of adhesin genes in cystitis and pyelonephritis isolates of *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* **89**: 188–194. doi:10.1016/j.micpath.2015.10.014.
- Eriksson, I., Gustafson, Y., Fagerström, L., and Olofsson, B. 2010. Prevalence and factors associated with urinary tract infections (UTIs) in very old women. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **50**(2): 132–135. doi:10.1016/j.archger.2009.02.013.
- Eto, D.S., Jones, T.A., Sundsbak, J.L., and Mulvey, M.A. 2007. Integrin-Mediated Host Cell Invasion by Type 1–Piliated Uropathogenic *Escherichia coli*. *PLOS Pathog.* **3**(7): e100. Public Library of Science. doi:10.1371/journal.ppat.0030100.
- Eto, D.S., Sundsbak, J.L., and Mulvey, M.A. 2006. Actin-gated intracellular growth and resurgence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* **8**(4): 704–717. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00691.x.
- European Centre for Disease Prevention and Control. 2021. Data from the ECDC Surveillance Atlas - Antimicrobial resistance. Available from <https://ecdc.europa.eu/> [accessed 16 June 2021].
- Faïs, T., Cougnoux, A., Dalmasso, G., Laurent, F., Delmas, J., and Bonnet, R. 2016. Antibiotic Activity of *Escherichia coli* against Multiresistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**(11): 6986–6988. doi:10.1128/AAC.00130-16.
- Ferjani, S., Saidani, M., Ennigrou, S., Hsairi, M., and Ben Redjeb, S. 2012. Virulence determinants, phylogenetic groups and fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from cystitis and pyelonephritis. *Pathol. Biol.* **60**(5): 270–274. doi:10.1016/j.patbio.2011.07.006.
- Fibke, C.D., Croxen, M.A., Geum, H.M., Glass, M., Wong, E., Avery, B.P., Daignault, D., Mulvey, M.R., Reid-Smith, R.J., Parmley, E.J., Portt, A., Boerlin, P., and Manges, A.R. 2019. Genomic Epidemiology of Major Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Lineages Causing Urinary Tract Infections in Young Women Across Canada. *Open Forum Infect. Dis.* **6**(11). doi:10.1093/ofid/ofz431.
- Fischbach, M.A., and Walsh, C.T. 2006. Assembly-Line Enzymology for Polyketide and Nonribosomal Peptide Antibiotics: Logic, Machinery, and Mechanisms. *Chem. Rev.* **106**(8): 3468–3496. doi:10.1021/cr0503097.
- Flores-Mireles, A.L., Walker, J.N., Caparon, M., and Hultgren, S.J. 2015. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**(5): 269–284. doi:10.1038/nrmicro3432.
- Foxman, B. 2010. The epidemiology of urinary tract infection. *Nat. Rev. Urol.* **7**(12): 653–660. doi:10.1038/nrurol.2010.190.

- Foxman, B. 2014. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **28**(1): 1–13. doi:10.1016/j.idc.2013.09.003.
- François, M., Hanslik, T., Dervaux, B., Strat, Y.L., Souty, C., Vaux, S., Maugat, S., Rondet, C., Sarazin, M., Heym, B., Coignard, B., and Rossignol, L. 2016. The economic burden of urinary tract infections in women visiting general practices in France: a cross-sectional survey. *BMC Health Serv. Res.* **16**(1): 1–10. BioMed Central. doi:10.1186/s12913-016-1620-2.
- Fukushi, Y., Orikasa, S., and Kagayama, M. 1979. An electron microscopic study of the interaction between vesical epithelium and *E. Coli*. *Invest. Urol.* **17**(1): 61–68.
- Garcie, C., Tronnet, S., Garénaux, A., McCarthy, A.J., Brachmann, A.O., Pényary, M., Houle, S., Nougayrède, J.-P., Piel, J., Taylor, P.W., Dozois, C.M., Genevaux, P., Oswald, E., and Martin, P. 2016. The bacterial stress-responsive Hsp90 chaperone (HtpG) is required for the production of the genotoxin colibactin and the siderophore yersiniabactin in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **214**(6): 916–924. doi:10.1093/infdis/jiw294.
- Garénaux, A., Caza, M., and Dozois, C.M. 2011. The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* **153**(1–2): 89–98. doi:10.1016/j.vetmic.2011.05.023.
- Gati, N.S., Middendorf-Bauchart, B., Bletz, S., Dobrindt, U., and Mellmann, A. 2019. Origin and Evolution of Hybrid Shiga Toxin-Producing and Uropathogenic *Escherichia coli* Strains of Sequence Type 141. *J. Clin. Microbiol.* **58**(1). doi:10.1128/JCM.01309-19.
- Gibani, M.M., Jones, E., Barton, A., Jin, C., Meek, J., Camara, S., Galal, U., Heinz, E., Rosenberg-Hasson, Y., Obermoser, G., Jones, C., Campbell, D., Black, C., Thomaidis-Brears, H., Darlow, C., Dold, C., Silva-Reyes, L., Blackwell, L., Lara-Tejero, M., Jiao, X., Stack, G., Blohmke, C.J., Hill, J., Angus, B., Dougan, G., Galán, J., and Pollard, A.J. 2019. Investigation of the role of typhoid toxin in acute typhoid fever in a human challenge model. *Nat. Med.* **25**(7): 1082–1088. Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41591-019-0505-4.
- Goneau, L.W., Hannan, T.J., MacPhee, R.A., Schwartz, D.J., Macklaim, J.M., Gloor, G.B., Razvi, H., Reid, G., Hultgren, S.J., and Burton, J.P. 2015. Subinhibitory Antibiotic Therapy Alters Recurrent Urinary Tract Infection Pathogenesis through Modulation of Bacterial Virulence and Host Immunity. *mBio* **6**(2): e00356-15. doi:10.1128/mBio.00356-15.
- Gordon, D.M., Geyik, S., Clermont, O., O'Brien, C.L., Huang, S., Abayasekara, C., Rajesh, A., Kennedy, K., Collignon, P., Pavli, P., Rodriguez, C., Johnston, B.D., Johnson, J.R., Decousser, J.-W., and Denamur, E. 2017. Fine-Scale Structure Analysis Shows Epidemic Patterns of Clonal Complex 95, a Cosmopolitan *Escherichia coli* Lineage Responsible for Extraintestinal Infection. *mSphere* **2**(3). doi:10.1128/mSphere.00168-17.
- Greene, S.E., Hibbing, M.E., Janetka, J., Chen, S.L., and Hultgren, S.J. 2015. Human Urine Decreases Function and Expression of Type 1 Pili in Uropathogenic *Escherichia coli*. *mBio* **6**(4): e00820-15. doi:10.1128/mBio.00820-15.
- Guarner, J. 2018. Buruli Ulcer: Review of a Neglected Skin Mycobacterial Disease. *J. Clin. Microbiol.* **56**(4). doi:10.1128/JCM.01507-17.
- Guerra, L., Teter, K., Lilley, B.N., Stenerlöv, B., Holmes, R.K., Ploegh, H.L., Sandvig, K., Thelestam, M., and Frisan, T. 2005. Cellular internalization of cytolethal distending toxin: a new end to a known pathway. *Cell. Microbiol.* **7**(7): 921–934. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00520.x.
- Guidi, R., Belluz, L.D.B., and Frisan, T. 2016. Bacterial genotoxin functions as immune-modulator and promotes host survival. *Microb. Cell Graz Austria* **3**(8): 355–357. doi:10.15698/mic2016.08.520.
- Guntaka, N.S., Healy, A.R., Crawford, J.M., Herzon, S.B., and Bruner, S.D. 2017. Structure and functional analysis of ClbQ, an unusual intermediate-releasing thioesterase from the colibactin biosynthetic pathway. *ACS Chem. Biol.* **12**(10): 2598–2608. doi:10.1021/acscchembio.7b00479.

- Guo, Y., Wang, J., Zhou, K., Lv, J., Wang, L., Gao, S., Keller, E.T., Zhang, Z.-S., Wang, Q., and Yao, Z. 2020. Cytotoxic necrotizing factor 1 promotes bladder cancer angiogenesis through activating RhoC. *FASEB J.* **34**(6): 7927–7940. doi:10.1096/fj.201903266RR.
- Guzmán-Chávez, F., Zwahlen, R.D., Bovenberg, R.A.L., and Driessen, A.J.M. 2018. Engineering of the Filamentous Fungus *Penicillium chrysogenum* as Cell Factory for Natural Products. *Front. Microbiol.* **9**. Frontiers. doi:10.3389/fmicb.2018.02768.
- Hagan, E.C., Lloyd, A.L., Rasko, D.A., Faerber, G.J., and Mobley, H.L.T. 2010. *Escherichia coli* global gene expression in urine from women with urinary tract infection. *PLoS Pathog.* **6**(11): e1001187. doi:10.1371/journal.ppat.1001187.
- Hamilton, C., Tan, L., Miethke, T., and Anand, P.K. 2017. Immunity to uropathogens: the emerging roles of inflammasomes. *Nat. Rev. Urol.* **14**(5): 284–295. doi:10.1038/nrurol.2017.25.
- Hancock, V., Seshasayee, A.S., Ussery, D.W., Luscombe, N.M., and Klemm, P. 2008. Transcriptomics and adaptive genomics of the asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972. *Mol. Genet. Genomics* **279**(5): 523–534. doi:10.1007/s00438-008-0330-9.
- Hannan, T.J., Mysorekar, I.U., Hung, C.S., Isaacson-Schmid, M.L., and Hultgren, S.J. 2010. Early Severe Inflammatory Responses to Uropathogenic *E. coli* Predispose to Chronic and Recurrent Urinary Tract Infection. *PLoS Pathog.* **6**(8). doi:10.1371/journal.ppat.1001042.
- Hannan, T.J., Roberts, P.L., Riehl, T.E., van der Post, S., Binkley, J.M., Schwartz, D.J., Miyoshi, H., Mack, M., Schwendener, R.A., Hooton, T.M., Stappenbeck, T.S., Hansson, G.C., Stenson, W.F., Colonna, M., Stapleton, A.E., and Hultgren, S.J. 2014. Inhibition of Cyclooxygenase-2 Prevents Chronic and Recurrent Cystitis. *EBioMedicine* **1**(1): 46–57. doi:10.1016/j.ebiom.2014.10.011.
- Hannan, T.J., Totsika, M., Mansfield, K.J., Moore, K.H., Schembri, M.A., and Hultgren, S.J. 2012. Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**(3): 616–648. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00339.x.
- Harding, G.K.M., and Ronald, A.R. 1994. The management of urinary infections; what have we learned in the past decade? *Int. J. Antimicrob. Agents* **4**(2): 83–88. doi:10.1016/0924-8579(94)90038-8.
- Hashemizadeh, Z., Kalantar-Neyestanaki, D., and Mansouri, S. 2017. Association between virulence profile, biofilm formation and phylogenetic groups of *Escherichia coli* causing urinary tract infection and the commensal gut microbiota: A comparative analysis. *Microb. Pathog.* **110**: 540–545. doi:10.1016/j.micpath.2017.07.046.
- Healy, A.R., and Herzon, S.B. 2017. Molecular Basis of Gut Microbiome-Associated Colorectal Cancer: A Synthetic Perspective. *J. Am. Chem. Soc.* **139**(42): 14817–14824. American Chemical Society. doi:10.1021/jacs.7b07807.
- Healy, A.R., Nikolayevskiy, H., Patel, J.R., Crawford, J.M., and Herzon, S.B. 2016. A Mechanistic Model for Colibactin-Induced Genotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* **138**(48): 15563–15570. doi:10.1021/jacs.6b10354.
- Healy, A.R., Wernke, K.M., Kim, C.S., Lees, N.R., Crawford, J.M., and Herzon, S.B. 2019. Synthesis and reactivity of precolibactin 886. *Nat. Chem.* **11**(10): 890–898. doi:10.1038/s41557-019-0338-2.
- Henninger, E.E., and Pursell, Z.F. 2014. DNA polymerase  $\epsilon$  and its roles in genome stability. *IUBMB Life* **66**(5): 339–351. doi:10.1002/iub.1276.
- Hicks, R.M., Walters, C.L., Elsebai, I., Aasser, A.B., Merzabani, M.E., and Gough, T.A. 1977. Demonstration of nitrosamines in human urine: preliminary observations on a possible etiology for bladder cancer in association with chronic urinary tract infections. *Proc. R. Soc. Med.* **70**(6): 413–417.
- Hidas, G., Billimek, J., Nam, A., Soltani, T., Kelly, M.S., Selby, B., Dorgalli, C., Wehbi, E., McAleer, I., McLorie, G., Greenfield, S., Kaplan, S.H., and Houry, A.E. 2015. Predicting the Risk of Breakthrough Urinary Tract Infections: Primary Vesicoureteral Reflux. *J. Urol.* **194**(5): 1396–1401. doi:10.1016/j.juro.2015.06.019.
- Hilt, E.E., McKinley, K., Pearce, M.M., Rosenfeld, A.B., Zilliox, M.J., Mueller, E.R., Brubaker, L., Gai, X., Wolfe, A.J., and Schreckenberger, P.C. 2014. Urine Is Not Sterile: Use of Enhanced Urine

- Culture Techniques To Detect Resident Bacterial Flora in the Adult Female Bladder. *J. Clin. Microbiol.* **52**(3): 871–876. American Society for Microbiology. doi:10.1128/JCM.02876-13.
- Hirayama, Y., Tsunematsu, Y., Yoshikawa, Y., Tamafune, R., Matsuzaki, N., Iwashita, Y., Ohnishi, I., Tanioka, F., Sato, M., Miyoshi, N., Mutoh, M., Ishikawa, H., Sugimura, H., Wakabayashi, K., and Watanabe, K. 2019. Activity-Based Probe for Screening of High-Colibactin Producers from Clinical Samples. *Org. Lett.* **21**(12): 4490–4494. American Chemical Society. doi:10.1021/acs.orglett.9b01345.
- Hirji, I., Guo, Z., Andersson, S.W., Hammar, N., and Gomez-Camirero, A. 2012. Incidence of urinary tract infection among patients with type 2 diabetes in the UK General Practice Research Database (GPRD). *J. Diabetes Complications* **26**(6): 513–516. doi:10.1016/j.jdiacomp.2012.06.008.
- Homburg, S., Oswald, E., Hacker, J., and Dobrindt, U. 2007. Expression analysis of the colibactin gene cluster coding for a novel polyketide in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **275**(2): 255–262. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00889.x.
- Hooton, T.M., Scholes, D., Hughes, J.P., Winter, C., Roberts, P.L., Stapleton, A.E., Stergachis, A., and Stamm, W.E. 1996. A prospective study of risk factors for symptomatic urinary tract infection in young women. *N. Engl. J. Med.* **335**(7): 468–474. doi:10.1056/NEJM199608153350703.
- Horvath, D.J., Li, B., Casper, T., Partida-Sanchez, S., Hunstad, D.A., Hultgren, S.J., and Justice, S.S. 2011. Morphological plasticity promotes resistance to phagocyte killing of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbes Infect.* **13**(5): 426–437. doi:10.1016/j.micinf.2010.12.004.
- Hull, R., Rudy, D., Donovan, W., Svanborg, C., Wieser, I., Stewart, C., and Darouiche, R. 2000. Urinary tract infection prophylaxis using *Escherichia coli* 83972 in spinal cord injured patients. *J. Urol.* **163**(3): 872–877. doi:10.1016/s0022-5347(05)67823-8.
- Iftekhhar, A., Berger, H., Bouznad, N., Heuberger, J., Boccellato, F., Dobrindt, U., Hermeking, H., Sigal, M., and Meyer, T.F. 2021. Genomic aberrations after short-term exposure to colibactin-producing *E. coli* transform primary colon epithelial cells. *Nat. Commun.* **12**(1): 1003. Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41467-021-21162-y.
- Jaureguy, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., Carbonnelle, E., Lortholary, O., Clermont, O., Denamur, E., Picard, B., Nassif, X., and Brisse, S. 2008. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* **9**: 560. doi:10.1186/1471-2164-9-560.
- Jiang, Y., Stornetta, A., Villalta, P.W., Wilson, M.R., Boudreau, P.D., Zha, L., Balbo, S., and Balskus, E.P. 2019. Reactivity of an Unusual Amidase May Explain Colibactin's DNA Cross-Linking Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **141**(29): 11489–11496. American Chemical Society. doi:10.1021/jacs.9b02453.
- Johansen, T.E.B., Botto, H., Cek, M., Grabe, M., Tenke, P., Wagenlehner, F.M.E., and Naber, K.G. 2011. Critical review of current definitions of urinary tract infections and proposal of an EAU/ESIU classification system. *Int. J. Antimicrob. Agents* **38**: 64–70. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.09.009.
- Johnson, J.R., Clabots, C., and Kuskowski, M.A. 2008a. Multiple-Host Sharing, Long-Term Persistence, and Virulence of *Escherichia coli* Clones from Human and Animal Household Members. *J. Clin. Microbiol.* **46**(12): 4078–4082. doi:10.1128/JCM.00980-08.
- Johnson, J.R., Johnston, B., Kuskowski, M.A., Nougayrede, J.-P., and Oswald, E. 2008b. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island. *J. Clin. Microbiol.* **46**(12): 3906–3911. doi:10.1128/JCM.00949-08.
- Johnson, J.R., Russo, T.A., Brown, J.J., and Stapleton, A. 1998. papG alleles of *Escherichia coli* strains causing first-episode or recurrent acute cystitis in adult women. *J. Infect. Dis.* **177**(1): 97–101. doi:10.1086/513824.
- Johnson, T.J., Danzeisen, J.L., Youmans, B., Case, K., Llop, K., Munoz-Aguayo, J., Flores-Figueroa, C., Aziz, M., Stoesser, N., Sokurenko, E., Price, L.B., and Johnson, J.R. 2016. Separate F-Type Plasmids Have Shaped the Evolution of the H30 Subclone of *Escherichia coli* Sequence Type

131. mSphere **1**(4). American Society for Microbiology Journals. doi:10.1128/mSphere.00121-16.
- Jørgensen, S.L., Stegger, M., Kudirkiene, E., Lilje, B., Poulsen, L.L., Ronco, T., Santos, T.P.D., Kiil, K., Bisgaard, M., Pedersen, K., Nolan, L.K., Price, L.B., Olsen, R.H., Andersen, P.S., and Christensen, H. 2019. Diversity and Population Overlap between Avian and Human *Escherichia coli* Belonging to Sequence Type 95. mSphere **4**(1): e00333-18. doi:10.1128/mSphere.00333-18.
- Justice, S.S., Hung, C., Theriot, J.A., Fletcher, D.A., Anderson, G.G., Footer, M.J., and Hultgren, S.J. 2004. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **101**(5): 1333–1338. doi:10.1073/pnas.0308125100.
- Justice, S.S., and Hunstad, D.A. 2012. UPEC Hemolysin: More Than Just for Making Holes. Cell Host Microbe **11**(1): 4–5. doi:10.1016/j.chom.2012.01.001.
- Justice, S.S., Hunstad, D.A., Seed, P.C., and Hultgren, S.J. 2006. Filamentation by *Escherichia coli* subverts innate defenses during urinary tract infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103**(52): 19884–19889. doi:10.1073/pnas.0606329104.
- Kallonen, T., Brodrick, H.J., Harris, S.R., Corander, J., Brown, N.M., Martin, V., Peacock, S.J., and 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**(8): 1437–1449. doi:10.1101/gr.216606.116.
- Kanamaru, S., Kurazono, H., Ishitoya, S., Terai, A., Habuchi, T., Nakano, M., Ogawa, O., and Yamamoto, S. 2003. Distribution and genetic association of putative uropathogenic virulence factors *ironN*, *iha*, *kpsMT*, *ompT* and *usp* in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Japan. J. Urol. **170**(6 Pt 1): 2490–2493. doi:10.1097/01.ju.0000094185.48467.dc.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L.T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. **2**(2): 123–140. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nrmicro818.
- Khandige, S., Asferg, C.A., Rasmussen, K.J., Larsen, M.J., Overgaard, M., Andersen, T.E., and Møller-Jensen, J. 2016. DamX Controls Reversible Cell Morphology Switching in Uropathogenic *Escherichia coli*. mBio **7**(4). doi:10.1128/mBio.00642-16.
- Kim, C.S., Turocy, T., Moon, G., Shine, E.E., and Crawford, J.M. 2021. *Escherichia coli* -Derived  $\gamma$ -Lactams and Structurally Related Metabolites Are Produced at the Intersection of Colibactin and Fatty Acid Biosynthesis. Org. Lett.: acs.orglett.1c02461. doi:10.1021/acs.orglett.1c02461.
- Klein, R.D., and Hultgren, S.J. 2020. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. Nat. Rev. Microbiol. doi:10.1038/s41579-020-0324-0.
- Klemm, P., Roos, V., Ulett, G.C., Svanborg, C., and Schembri, M.A. 2006. Molecular Characterization of the *Escherichia coli* Asymptomatic Bacteriuria Strain 83972: the Taming of a Pathogen. Infect. Immun. **74**(1): 781–785. doi:10.1128/IAI.74.1.781-785.2006.
- Kobayashi, T., Owczarek, T.B., McKiernan, J.M., and Abate-Shen, C. 2015. Modelling bladder cancer in mice: opportunities and challenges. Nat. Rev. Cancer **15**(1): 42–54. doi:10.1038/nrc3858.
- Krieger, J.N., Dobrindt, U., Riley, D.E., and Oswald, E. 2011. Acute *Escherichia coli* prostatitis in previously health young men: Bacterial virulence factors, antimicrobial resistance, and clinical outcomes. Urology **77**(6): 1420–1425. doi:10.1016/j.urology.2010.12.059.
- Kudinha, T., Johnson, J.R., Andrew, S.D., Kong, F., Anderson, P., and Gilbert, G.L. 2013a. Distribution of phylogenetic groups, sequence type ST131, and virulence-associated traits among *Escherichia coli* isolates from men with pyelonephritis or cystitis and healthy controls. Clin. Microbiol. Infect. **19**(4): E173–E180. doi:10.1111/1469-0691.12123.
- Kudinha, T., Johnson, J.R., Andrew, S.D., Kong, F., Anderson, P., and Gilbert, G.L. 2013b. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from children with urinary tract infection and from healthy carriers. Pediatr. Infect. Dis. J. **32**(5): 543–548. doi:10.1097/INF.0b013e31828ba3f1.

- Labat, F., Pradillon, O., Garry, L., Peuchmaur, M., Fantin, B., and Denamur, E. 2005. Mutator phenotype confers advantage in *Escherichia coli* chronic urinary tract infection pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **44**(3): 317–321. doi:10.1016/j.femsim.2005.01.003.
- Lacerda Mariano, L., and Ingersoll, M.A. 2018. Bladder resident macrophages: Mucosal sentinels. *Cell. Immunol.* **330**: 136–141. doi:10.1016/j.cellimm.2018.01.018.
- Lacerda Mariano, L., and Ingersoll, M.A. 2020. The immune response to infection in the bladder. *Nat. Rev. Urol.* **17**(8): 439–458. doi:10.1038/s41585-020-0350-8.
- Landraud, L., Pulcini, C., Gounon, P., Flatau, G., Boquet, P., and Lemichez, E. 2004. *E. coli* CNF1 toxin: a two-in-one system for host-cell invasion. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**(7–8): 513–518. doi:10.1078/1438-4221-00295.
- Lane, M.C., and Mobley, H.L.T. 2007. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int.* **72**(1): 19–25. doi:10.1038/sj.ki.5002230.
- Le Gall, T., Clermont, O., Gouriou, S., Picard, B., Nassif, X., Denamur, E., and Tenailon, O. 2007. Extraintestinal Virulence Is a Coincidental By-Product of Commensalism in B2 Phylogenetic Group *Escherichia coli* Strains. *Mol. Biol. Evol.* **24**(11): 2373–2384. doi:10.1093/molbev/msm172.
- Lee-Six, H., Olafsson, S., Ellis, P., Osborne, R.J., Sanders, M.A., Moore, L., Georgakopoulos, N., Torrente, F., Noorani, A., Goddard, M., Robinson, P., Coorens, T.H.H., O'Neill, L., Alder, C., Wang, J., Fitzgerald, R.C., Zilbauer, M., Coleman, N., Saeb-Parsy, K., Martincorena, I., Campbell, P.J., and Stratton, M.R. 2019. The landscape of somatic mutation in normal colorectal epithelial cells. *Nature* **574**(7779): 532–537. doi:10.1038/s41586-019-1672-7.
- Lenherr, S.M., Clemens, J.Q., Braffett, B.H., Cleary, P.A., Dunn, R.L., Hotaling, J.M., Jacobson, A.M., Kim, C., Herman, W., Brown, J.S., Wessells, H., Sarma, A.V., and DCCT/EDIC Research Group. 2016. Glycemic Control and Urinary Tract Infections in Women with Type 1 Diabetes: Results from the DCCT/EDIC. *J. Urol.* **196**(4): 1129–1135. doi:10.1016/j.juro.2016.04.071.
- Lerner, S.P., McConkey, D.J., Hoadley, K.A., Chan, K.S., Kim, W.Y., Radvanyi, F., Höglund, M., and Real, F.X. 2016. Bladder cancer molecular taxonomy: Summary from a consensus meeting. *Bladder Cancer Amst. Neth.* **2**(1): 37–47. doi:10.3233/BLC-150037.
- Lewis, A.J., Richards, A.C., and Mulvey, M.A. 2016. Invasion of Host Cells and Tissues by Uropathogenic Bacteria. *Microbiol. Spectr.* **4**(6). doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0026-2016.
- Li, B., Smith, P., Horvath, D.J., Romesberg, F.E., and Justice, S.S. 2010. SOS regulatory elements are essential for UPEC pathogenesis. *Microbes Infect.* **12**(8–9): 662–668. doi:10.1016/j.micinf.2010.04.009.
- Li, Z.-R., Li, J., Cai, W., Lai, J.Y.H., McKinnie, S.M.K., Zhang, W.-P., Moore, B.S., Zhang, W., and Qian, P.-Y. 2019. Macrocyclic colibactin induces DNA double-strand breaks via copper-mediated oxidative cleavage. *Nat. Chem.* **11**(10): 880–889. Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41557-019-0317-7.
- Li, Z.-R., Li, J., Gu, J.-P., Lai, J.Y.H., Duggan, B.M., Zhang, W.-P., Li, Z.-L., Li, Y.-X., Tong, R.-B., Xu, Y., Lin, D.-H., Moore, B.S., and Qian, P.-Y. 2016. Divergent biosynthesis yields a cytotoxic aminomalonate-containing precolibactin. *Nat. Chem. Biol.* **12**(10): 773–775. doi:10.1038/nchembio.2157.
- Li, Z.-R., Li, Y., Lai, J.Y.H., Tang, J., Wang, B., Lu, L., Zhu, G., Wu, X., Xu, Y., and Qian, P.-Y. 2015. Critical Intermediates Reveal New Biosynthetic Events in the Enigmatic Colibactin Pathway. *ChemBiochem Eur. J. Chem. Biol.* **16**(12): 1715–1719. doi:10.1002/cbic.201500239.
- Lindberg, U., Hanson, L.A., Jodal, U., Lidin-Janson, G., Lincoln, K., and Olling, S. 1975. Asymptomatic bacteriuria in schoolgirls. II. Differences in *Escherichia coli* causing asymptomatic bacteriuria. *Acta Paediatr. Scand.* **64**(3): 432–436. doi:10.1111/j.1651-2227.1975.tb03860.x.
- Little, J.B. 2003. Genomic instability and bystander effects: a historical perspective. *Oncogene* **22**(45): 6978–6987. doi:10.1038/sj.onc.1206988.
- Lopès, A., Billard, E., Casse, A.H., Villéger, R., Veziant, J., Roche, G., Carrier, G., Sauvanet, P., Briat, A., Pagès, F., Naimi, S., Pezet, D., Barnich, N., Dumas, B., and Bonnet, M. 2020. Colibactin-

- positive *Escherichia coli* induce a procarcinogenic immune environment leading to immunotherapy resistance in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **146**(11): 3147–3159. doi:<https://doi.org/10.1002/ijc.32920>.
- Lu, M.-C., Chen, Y.-T., Chiang, M.-K., Wang, Y.-C., Hsiao, P.-Y., Huang, Y.-J., Lin, C.-T., Cheng, C.-C., Liang, C.-L., and Lai, Y.-C. 2017. Colibactin Contributes to the Hypervirulence of pks+ K1 CC23 *Klebsiella pneumoniae* in Mouse Meningitis Infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**: 103. doi:[10.3389/fcimb.2017.00103](https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00103).
- Lucas, C., Salesse, L., Hoang, M.H.T., Bonnet, M., Sauvanet, P., Larabi, A., Godfraind, C., Gagnière, J., Pezet, D., Rosenstiel, P., Barnich, N., Bonnet, R., Dalmaso, G., and Nguyen, H.T.T. 2020. Autophagy of Intestinal Epithelial Cells Inhibits Colorectal Carcinogenesis Induced by Colibactin-Producing *Escherichia coli* in ApcMin/+ Mice. *Gastroenterology* **158**(5): 1373–1388. doi:[10.1053/j.gastro.2019.12.026](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.12.026).
- Luo, Y., Ma, Y., Zhao, Q., Wang, L., Guo, L., Ye, L., Zhang, Y., and Yang, J. 2012. Similarity and Divergence of Phylogenies, Antimicrobial Susceptibilities, and Virulence Factor Profiles of *Escherichia coli* Isolates Causing Recurrent Urinary Tract Infections That Persist or Result from Reinfection. *J. Clin. Microbiol.* **50**(12): 4002–4007. doi:[10.1128/JCM.02086-12](https://doi.org/10.1128/JCM.02086-12).
- Marcq, I., Martin, P., Payros, D., Cuevas-Ramos, G., Boury, M., Watrin, C., Nougayrède, J.-P., Olier, M., and Oswald, E. 2014. The genotoxin colibactin exacerbates lymphopenia and decreases survival rate in mice infected with septicemic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **210**(2): 285–294. doi:[10.1093/infdis/jiu071](https://doi.org/10.1093/infdis/jiu071).
- Martin, D., Fougnot, S., Grobost, F., Thibaut-Jovelin, S., Ballereau, F., Gueudet, T., de Mouy, D., Robert, J., and ONERBA-ville network. 2016. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in community-onset urinary tract infections in France in 2013. *J. Infect.* **72**(2): 201–206. doi:[10.1016/j.jinf.2015.11.009](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.11.009).
- Martin, P., Marcq, I., Magistro, G., Penary, M., Garcie, C., Payros, D., Boury, M., Olier, M., Nougayrède, J.-P., Audebert, M., Chalut, C., Schubert, S., and Oswald, E. 2013. Interplay between siderophores and colibactin genotoxin biosynthetic pathways in *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* **9**(7): e1003437. doi:[10.1371/journal.ppat.1003437](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003437).
- Martin, P., Tronnet, S., Garcie, C., and Oswald, E. 2017. Interplay between siderophores and colibactin genotoxin in *Escherichia coli*: Siderophores and Colibactin Genotoxin in *E. coli*. *IUBMB Life* **69**(6): 435–441. doi:[10.1002/iub.1612](https://doi.org/10.1002/iub.1612).
- Martinez, J.J., Mulvey, M.A., Schilling, J.D., Pinkner, J.S., and Hultgren, S.J. 2000. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J.* **19**(12): 2803–2812. doi:[10.1093/emboj/19.12.2803](https://doi.org/10.1093/emboj/19.12.2803).
- Massip, C., Branchu, P., Bossuet-Grief, N., Chagneau, C.V., Gaillard, D., Martin, P., Boury, M., Sécher, T., Dubois, D., Nougayrède, J.-P., and Oswald, E. 2019. Deciphering the interplay between the genotoxic and probiotic activities of *Escherichia coli* Nissle 1917. *PLOS Pathog.* **15**(9): e1008029. doi:[10.1371/journal.ppat.1008029](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008029).
- Massip, C., Chagneau, C.V., Boury, M., and Oswald, E. 2020. The synergistic triad between microcin, colibactin, and salmochelin gene clusters in uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbes Infect.* **22**(3): 144–147. doi:[10.1016/j.micinf.2020.01.001](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.01.001).
- McCarthy, A.J., Martin, P., Cloup, E., Stabler, R.A., Oswald, E., and Taylor, P.W. 2015. The genotoxin colibactin is a determinant of virulence in *Escherichia coli* K1 experimental neonatal systemic infection. *Infect. Immun.* **83**(9): 3704–3711. doi:[10.1128/IAI.00716-15](https://doi.org/10.1128/IAI.00716-15).
- McNally, A., Kallonen, T., Connor, C., Abudahab, K., Aanensen, D.M., Horner, C., Peacock, S.J., Parkhill, J., Croucher, N.J., and Corander, J. 2019. Diversification of Colonization Factors in a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Lineage Evolving under Negative Frequency-Dependent Selection. *mBio* **10**(2). American Society for Microbiology. doi:[10.1128/mBio.00644-19](https://doi.org/10.1128/mBio.00644-19).
- Miao, Y., Li, G., Zhang, X., Xu, H., and Abraham, S.N. 2015. A TRP Channel Senses Lysosome Neutralization by Pathogens to Trigger Their Expulsion. *Cell* **161**(6): 1306–1319. doi:[10.1016/j.cell.2015.05.009](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.009).

- Micenková, L., Beňová, A., Frankovičová, L., Bosák, J., Vrba, M., Ševčíková, A., Kmeťová, M., and Šmajš, D. 2017. Human *Escherichia coli* isolates from hemocultures: Septicemia linked to urogenital tract infections is caused by isolates harboring more virulence genes than bacteraemia linked to other conditions. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **307**(3): 182–189. doi:10.1016/j.ijmm.2017.02.003.
- Molan, K., Podlesek, Z., Hodnik, V., Butala, M., Oswald, E., and Žgur Bertok, D. 2019. The *Escherichia coli* colibactin resistance protein ClbS is a novel DNA binding protein that protects DNA from nucleolytic degradation. *DNA Repair* **79**: 50–54. doi:10.1016/j.dnarep.2019.05.003.
- Moreno, E., Andreu, A., Pigrau, C., Kuskowski, M.A., Johnson, J.R., and Prats, G. 2008. Relationship between *Escherichia coli* strains causing acute cystitis in women and the fecal *E. coli* population of the host. *J. Clin. Microbiol.* **46**(8): 2529–2534. doi:10.1128/JCM.00813-08.
- Moreno, E., Johnson, J.R., Pérez, T., Prats, G., Kuskowski, M.A., and Andreu, A. 2009. Structure and urovirulence characteristics of the fecal *Escherichia coli* population among healthy women. *Microbes Infect.* **11**(2): 274–280. doi:10.1016/j.micinf.2008.12.002.
- Mousa, J.J., Newsome, R.C., Yang, Y., Jobin, C., and Bruner, S.D. 2017. ClbM is a versatile, cation-promiscuous MATE transporter found in the colibactin biosynthetic gene cluster. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **482**(4): 1233–1239. doi:10.1016/j.bbrc.2016.12.018.
- Mousa, J.J., Yang, Y., Tomkovich, S., Shima, A., Newsome, R.C., Tripathi, P., Oswald, E., Bruner, S.D., and Jobin, C. 2016. MATE transport of the *E. coli*-derived genotoxin colibactin. *Nat. Microbiol.* **1**: 15009. doi:10.1038/nmicrobiol.2015.9.
- Mulvey, M.A., Lopez-Boado, Y.S., Wilson, C.L., Roth, R., Parks, W.C., Heuser, J., and Hultgren, S.J. 1998. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **282**(5393): 1494–1497. doi:10.1126/science.282.5393.1494.
- Mulvey, M.A., Schilling, J.D., and Hultgren, S.J. 2001. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect. Immun.* **69**(7): 4572–4579. doi:10.1128/IAI.69.7.4572-4579.2001.
- Murthy, A., Phan, M.-D., Peters, K.M., Nhu, N.T.K., Welch, R.A., Ulett, G.C., Schembri, M.A., and Sweet, M.J. 2018. Regulation of hemolysin in uropathogenic *Escherichia coli* fine-tunes killing of human macrophages. *Virulence* **9**(1): 967–980. doi:10.1080/21505594.2018.1465786.
- Murthy, A.M.V., Sullivan, M.J., Nhu, N.T.K., Lo, A.W., Phan, M.-D., Peters, K.M., Boucher, D., Schroder, K., Beatson, S.A., Ulett, G.C., Schembri, M.A., and Sweet, M.J. 2019. Variation in hemolysin A expression between uropathogenic *Escherichia coli* isolates determines NLRP3-dependent vs. -independent macrophage cell death and host colonization. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **33**(6): 7437–7450. doi:10.1096/fj.201802100R.
- Mysorekar, I.U., and Hultgren, S.J. 2006. Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**(38): 14170–14175. doi:10.1073/pnas.0602136103.
- Nagamatsu, K., Hannan, T.J., Guest, R.L., Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Binkley, J., Dodson, K., Raivio, T.L., and Hultgren, S.J. 2015. Dysregulation of *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**(8): E871–E880. doi:10.1073/pnas.1500374112.
- Nicolle, L.E., Bradley, S., Colgan, R., Rice, J.C., Schaeffer, A., and Hooton, T.M. 2005. Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clin. Infect. Dis.*: 643–654. doi:10.1086/427507.
- Nicolle, L.E., Gupta, K., Bradley, S.F., Colgan, R., DeMuri, G.P., Drekonja, D., Eckert, L.O., Geerlings, S.E., Köves, B., Hooton, T.M., Juthani-Mehta, M., Knight, S.L., Saint, S., Schaeffer, A.J., Trautner, B., Wullt, B., and Siemieniuk, R. 2019. Clinical Practice Guideline for the Management of Asymptomatic Bacteriuria: 2019 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **68**(10): e83–e110. doi:10.1093/cid/ciy1121.
- Nielubowicz, G.R., and Mobley, H.L.T. 2010. Host–pathogen interactions in urinary tract infection. *Nat. Rev. Urol.* **7**(8): 430–441. doi:10.1038/nrurol.2010.101.

- Nipic, D., Podlesek, Z., Budic, M., crnigoj, M., and Zgur-Bertok, D. 2013. Escherichia coli Uropathogenic-Specific Protein, Usp, Is a Bacteriocin-Like Genotoxin. *J. Infect. Dis.* **208**(10): 1545–1552. doi:10.1093/infdis/jit480.
- Nougayrède, J.-P., Chagneau, C.V., Motta, J.-P., Bossuet-Greif, N., Belloy, M., Taieb, F., Gratadoux, J.-J., Thomas, M., Langella, P., and Oswald, E. 2021. A Toxic Friend: Genotoxic and Mutagenic Activity of the Probiotic Strain Escherichia coli Nissle 1917. *mSphere* **6**(4): e0062421. doi:10.1128/mSphere.00624-21.
- Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., and Oswald, E. 2006. Escherichia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* **313**(5788): 848–851. doi:10.1126/science.1127059.
- Nowrouzian, F.L., and Oswald, E. 2012. Escherichia coli strains with the capacity for long-term persistence in the bowel microbiota carry the potentially genotoxic pks island. *Microb. Pathog.* **53**(3–4): 180–182. doi:10.1016/j.micpath.2012.05.011.
- O’Brien, V.P., Hannan, T.J., Yu, L., Livny, J., Roberson, E.D.O., Schwartz, D.J., Souza, S., Mendelsohn, C.L., Colonna, M., Lewis, A.L., and Hultgren, S.J. 2017. A mucosal imprint left by prior Escherichia coli bladder infection sensitizes to recurrent disease. *Nat. Microbiol.* **2**(1): 16196. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.196.
- Olier, M., Marcq, I., Salvador-Cartier, C., Secher, T., Dobrindt, U., Boury, M., Bacquié, V., Pényary, M., Gaultier, E., Nougayrède, J.-P., Fioramonti, J., and Oswald, E. 2012. Genotoxicity of Escherichia coli Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. *Gut Microbes* **3**(6): 501–509. doi:10.4161/gmic.21737.
- Oliero, M., Calvé, A., Fragoso, G., Cuisiniere, T., Hajjar, R., Dobrindt, U., and Santos, M.M. 2021. Oligosaccharides increase the genotoxic effect of colibactin produced by pks+ Escherichia coli strains. *BMC Cancer* **21**(1): 172. doi:10.1186/s12885-021-07876-8.
- Papafotiou, G., Paraskevopoulou, V., Vasilaki, E., Kanaki, Z., Paschalidis, N., and Klinakis, A. 2016. KRT14 marks a subpopulation of bladder basal cells with pivotal role in regeneration and tumorigenesis. *Nat. Commun.* **7**. doi:10.1038/ncomms11914.
- Paraskevopoulou, V., Papafotiou, G., and Klinakis, A. 2016. KRT14 marks bladder progenitors. *Cell Cycle* **15**(23): 3161–3162. doi:10.1080/15384101.2016.1220722.
- Parret, A.H.A., and De Mot, R. 2002. Escherichia coli’s uropathogenic-specific protein: a bacteriocin promoting infectivity? *Microbiol. Read. Engl.* **148**(Pt 6): 1604–1606. doi:10.1099/00221287-148-6-1604.
- Payne, J.A.E., Schoppet, M., Hansen, M.H., and Cryle, M.J. 2017. Diversity of nature’s assembly lines – recent discoveries in non-ribosomal peptide synthesis. *Mol. Biosyst.* **13**(1): 9–22. doi:10.1039/C6MB00675B.
- Payros, D., Dobrindt, U., Martin, P., Secher, T., Bracarense, A.P.F.L., Boury, M., Laffitte, J., Pinton, P., Oswald, E., and Oswald, I.P. 2017. The food contaminant Deoxynivalenol exacerbates the genotoxicity of gut microbiota. *mBio* **8**(2): e00007-17. doi:10.1128/mBio.00007-17.
- Payros, D., Secher, T., Boury, M., Brehin, C., Ménard, S., Salvador-Cartier, C., Cuevas-Ramos, G., Watrin, C., Marcq, I., Nougayrède, J.-P., Dubois, D., Bedu, A., Garnier, F., Clermont, O., Denamur, E., Plaisancié, P., Theodorou, V., Fioramonti, J., Olier, M., and Oswald, E. 2014. Maternally acquired genotoxic Escherichia coli alters offspring’s intestinal homeostasis. *Gut Microbes* **5**(3): 313–325. doi:10.4161/gmic.28932.
- Pérez-Berezo, T., Pujo, J., Martin, P., Le Faouder, P., Galano, J.-M., Guy, A., Knauf, C., Tabet, J.C., Tronnet, S., Barreau, F., Heuillet, M., Dietrich, G., Bertrand-Michel, J., Durand, T., Oswald, E., and Cenac, N. 2017. Identification of an analgesic lipopeptide produced by the probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917. *Nat. Commun.* **8**(1): 1314. doi:10.1038/s41467-017-01403-9.
- Pitout, J.D.D., and Finn, T.J. 2020. The evolutionary puzzle of Escherichia coli ST131. *Infect. Genet. Evol.* **81**: 104265. doi:10.1016/j.meegid.2020.104265.
- Pleguezuelos-Manzano, C., Puschhof, J., Huber, A.R., Hoeck, A. van, Wood, H.M., Nomburg, J., Gurjao, C., Manders, F., Dalmaso, G., Stege, P.B., Paganelli, F.L., Geurts, M.H., Beumer, J.,

- Mizutani, T., Miao, Y., Linden, R. van der, Elst, S. van der, Garcia, K.C., Top, J., Willems, R.J.L., Giannakis, M., Bonnet, R., Quirke, P., Meyerson, M., Cuppen, E., Boxtel, R. van, and Clevers, H. 2020. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks + *E. coli*. *Nature* **580**(7802): 269–273. Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41586-020-2080-8.
- Pottegård, A., Kristensen, K.B., Friis, S., Hallas, J., Jensen, J.B., and Nørgaard, M. 2020. Urinary tract infections and risk of squamous cell carcinoma bladder cancer: A Danish nationwide case-control study. *Int. J. Cancer* **146**(7): 1930–1936. doi:10.1002/ijc.32842.
- Prorok-Hamon, M., Friswell, M.K., Alswied, A., Roberts, C.L., Song, F., Flanagan, P.K., Knight, P., Codling, C., Marchesi, J.R., Winstanley, C., Hall, N., Rhodes, J.M., and Campbell, B.J. 2014. Colonic mucosa-associated diffusely adherent afaC+ *Escherichia coli* expressing lpfA and pks are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Gut* **63**(5): 761–770. BMJ Publishing Group. doi:10.1136/gutjnl-2013-304739.
- Putze, J., Hennequin, C., Nougayrède, J.-P., Zhang, W., Homburg, S., Karch, H., Bringer, M.-A., Fayolle, C., Carniel, E., Rabsch, W., Oelschlaeger, T.A., Oswald, E., Forestier, C., Hacker, J., and Dobrindt, U. 2009. Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family Enterobacteriaceae. *Infect. Immun.* **77**(11): 4696–4703. doi:10.1128/IAI.00522-09.
- Reigstad, C.S., Hultgren, S.J., and Gordon, J.I. 2007. Functional Genomic Studies of Uropathogenic *Escherichia coli* and Host Urothelial Cells when Intracellular Bacterial Communities Are Assembled. *J. Biol. Chem.* **282**(29): 21259–21267. doi:10.1074/jbc.M611502200.
- RESAPATH. 2020. Rapport annuel 2019 du RESAPATH | Réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales. Available from <https://resapath.anses.fr/> [accessed 16 June 2021].
- Rice, J.C., Peng, T., Spence, J.S., Wang, H.-Q., Goldblum, R.M., Corthésy, B., and Nowicki, B.J. 2005. Pyelonephritic *Escherichia coli* expressing P fimbriae decrease immune response of the mouse kidney. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **16**(12): 3583–3591. doi:10.1681/ASN.2005030243.
- Ristow, L.C., and Welch, R.A. 2016. Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: A cloak or a dagger? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1858**(3): 538–545. doi:10.1016/j.bbmem.2015.08.015.
- Robino, L., Scavone, P., Araujo, L., Algorta, G., Zunino, P., and Vignoli, R. 2013. Detection of intracellular bacterial communities in a child with *Escherichia coli* recurrent urinary tract infections. *Pathog. Dis.* **68**(3): 78–81. doi:10.1111/2049-632X.12047.
- Roos, V., and Klemm, P. 2006. Global Gene Expression Profiling of the Asymptomatic Bacteriuria *Escherichia coli* Strain 83972 in the Human Urinary Tract. *Infect. Immun.* **74**(6): 3565–3575. doi:10.1128/IAI.01959-05.
- Roos, V., Ulett, G.C., Schembri, M.A., and Klemm, P. 2006. The asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 outcompetes uropathogenic *E. coli* strains in human urine. *Infect. Immun.* **74**(1): 615–624. doi:10.1128/IAI.74.1.615-624.2006.
- Rosen, D.A., Hooton, T.M., Stamm, W.E., Humphrey, P.A., and Hultgren, S.J. 2007. Detection of Intracellular Bacterial Communities in Human Urinary Tract Infection. *PLoS Med.* **4**(12). doi:10.1371/journal.pmed.0040329.
- Rosen, J.M., and Klumpp, D.J. 2014. Mechanisms of pain from urinary tract infection: UTI pain mechanisms. *Int. J. Urol.* **21**: 26–32. doi:10.1111/iju.12309.
- Rouprêt, M., Pignot, G., Masson-Lecomte, A., Compérat, E., Audenet, F., Roumiguié, M., Houédé, N., Larré, S., Brunelle, S., Xylinas, E., Neuzillet, Y., and Méjean, A. 2020. Recommandations françaises du Comité de cancérologie de l'AFU – actualisation 2020–2022 : tumeurs de la vessie. *Prog. En Urol.* **30**(12): S78–S135. doi:10.1016/S1166-7087(20)30751-X.
- Rowe, T.A., and Juthani-Mehta, M. 2014. Diagnosis and Management of Urinary Tract Infection in Older Adults. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **28**(1): 75–89. doi:10.1016/j.idc.2013.10.004.
- Rudick, C.N., Billips, B.K., Pavlov, V.I., Yaggie, R.E., Schaeffer, A.J., and Klumpp, D.J. 2010. Host-Pathogen Interactions Mediating Pain of Urinary Tract Infection. *J. Infect. Dis.* **201**(8): 1240–1249. doi:10.1086/651275.

- Rudick, C.N., Jiang, M., Yaggie, R.E., Pavlov, V.I., Done, J., Heckman, C.J., Whitfield, C., Schaeffer, A.J., and Klumpp, D.J. 2012. O-antigen modulates infection-induced pain states. *PLoS One* **7**(8): e41273. doi:10.1371/journal.pone.0041273.
- Ruiz, J., Simon, K., Horcajada, J.P., Velasco, M., Barranco, M., Roig, G., Moreno-Martinez, A., Martinez, J.A., Jimenez de Anta, T., Mensa, J., and Vila, J. 2002. Differences in Virulence Factors among Clinical Isolates of *Escherichia coli* Causing Cystitis and Pyelonephritis in Women and Prostatitis in Men. *J. Clin. Microbiol.* **40**(12): 4445–4449. doi:10.1128/JCM.40.12.4445-4449.2002.
- Saginala, K., Barsouk, A., Aluru, J.S., Rawla, P., Padala, S.A., and Barsouk, A. 2020. Epidemiology of bladder cancer. *Med. Sci. Basel Switz.* **8**(1). doi:10.3390/medsci8010015.
- Salesse, L., Lucas, C., Hoang, M.H.T., Sauvanet, P., Rezard, A., Rosenstiel, P., Damon-Soubeyrand, C., Barnich, N., Godfraind, C., Dalmasso, G., and Nguyen, H.T.T. 2021. Colibactin-Producing *Escherichia coli* Induce the Formation of Invasive Carcinomas in a Chronic Inflammation-Associated Mouse Model. *Cancers* **13**(9). doi:10.3390/cancers13092060.
- Salvador, E., Wagenlehner, F., Köhler, C.-D., Mellmann, A., Hacker, J., Svanborg, C., and Dobrindt, U. 2012. 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. *Infect. Immun.* **80**(2): 668–678. doi:10.1128/IAI.06191-11.
- Santé publique France. 2019. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, mai-juin 2017. Available from <http://www.santepubliquefrance.fr/> [accessed 15 June 2021].
- Santé Publique France. 2019. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Tumeurs solides : Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Available from <https://www.santepubliquefrance.fr/import/estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-france-metropolitaine-entre-1990-et-2018-tumeurs-solides-etude-a-partir> [accessed 3 July 2021].
- Santé Publique France. 2020. Surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques en soins de ville et en établissements pour personnes âgées dépendantes. Mission Primo. Résultats préliminaires 2019. Available from </import/surveillance-de-la-resistance-bacterienne-aux-antibiotiques-en-soins-de-ville-et-en-etablissements-pour-personnes-agees-dependantes.-mission-primo> [accessed 16 June 2021].
- Santé Publique France. 2021. Surveillance de la consommation des antibiotiques et des résistances bactériennes en établissement de santé. Mission SPARES, résultats 2019. Available from </import/surveillance-de-la-consommation-des-antibiotiques-et-des-resistances-bacteriennes-en-etablissement-de-sante.-mission-s pares-resultats-2019> [accessed 16 June 2021].
- Scholes, D., Hooton, T.M., Roberts, P.L., Stapleton, A.E., Gupta, K., and Stamm, W.E. 2000. Risk Factors for Recurrent Urinary Tract Infection in Young Women. *J. Infect. Dis.* **182**(4): 1177–1182. doi:10.1086/315827.
- Schreiber, H.L., Conover, M.S., Chou, W.-C., Hibbing, M.E., Manson, A.L., Dodson, K.W., Hannan, T.J., Roberts, P.L., Stapleton, A.E., Hooton, T.M., Livny, J., Earl, A.M., and Hultgren, S.J. 2017a. Bacterial virulence phenotypes of *Escherichia coli* and host susceptibility determines risk for urinary tract infections. *Sci. Transl. Med.* **9**(382): eaaf1283. doi:10.1126/scitranslmed.aaf1283.
- Schreiber, H.L., Spaulding, C.N., Dodson, K.W., Livny, J., and Hultgren, S.J. 2017b. One size doesn't fit all: unraveling the diversity of factors and interactions that drive *E. coli* urovirulence. *Ann. Transl. Med.* **5**(2). doi:10.21037/atm.2016.12.73.
- Schwan, W.R. 2011. Regulation of fim genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *World J. Clin. Infect. Dis.* **1**(1): 17–25. doi:10.5495/wjcid.v1.i1.17.

- Schwartz, D.J., Chen, S.L., Hultgren, S.J., and Seed, P.C. 2011. Population dynamics and niche distribution of uropathogenic *Escherichia coli* during acute and chronic urinary tract infection. *Infect. Immun.* **79**(10): 4250–4259. doi:10.1128/IAI.05339-11.
- Secher, T., Samba-Louaka, A., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. 2013. *Escherichia coli* producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian cells. *PLoS One* **8**(10): e77157. doi:10.1371/journal.pone.0077157.
- Shea, A.E., Marzoa, J., Himpsl, S.D., Smith, S.N., Zhao, L., Tran, L., and Mobley, H.L.T. 2020. *Escherichia coli* CFT073 Fitness Factors during Urinary Tract Infection: Identification Using an Ordered Transposon Library. *Appl. Environ. Microbiol.* **86**(13). doi:10.1128/AEM.00691-20.
- Silpe, J.E., Wong, J.W.H., Owen, S.V., Baym, M., and Balskus, E.P. 2021. The gut bacterial natural product colibactin triggers induction of latent viruses in diverse bacteria. *bioRxiv*: 2021.05.24.445430. Cold Spring Harbor Laboratory. doi:10.1101/2021.05.24.445430.
- Smith, Y.C., Rasmussen, S.B., Grande, K.K., Conran, R.M., and O'Brien, A.D. 2008. Hemolysin of Uropathogenic *Escherichia coli* Evokes Extensive Shedding of the Uroepithelium and Hemorrhage in Bladder Tissue within the First 24 Hours after Intraurethral Inoculation of Mice. *Infect. Immun.* **76**(7): 2978–2990. American Society for Microbiology. doi:10.1128/IAI.00075-08.
- Sokurenko, E. 2016. Pathoadaptive Mutations in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* **4**(2): 4.2.01. American Society for Microbiology. doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0020-2015.
- Sokurenko, E.V., Gomulkiewicz, R., and Dykhuizen, D.E. 2006. Source–sink dynamics of virulence evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**(7): 548–555. doi:10.1038/nrmicro1446.
- Spaulding, C.N., Klein, R.D., Ruer, S., Kau, A.L., Schreiber, H.L., Cusumano, Z.T., Dodson, K.W., Pinkner, J.S., Fremont, D.H., Janetka, J.W., Remaut, H., Gordon, J.I., and Hultgren, S.J. 2017. Selective depletion of uropathogenic *E. coli* from the gut by a FimH antagonist. *Nature* **546**(7659): 528–532. doi:10.1038/nature22972.
- Spaulding, N.C., and Hultgren, J.S. 2016. Adhesive Pili in UTI Pathogenesis and Drug Development. *Pathogens* **5**(1). doi:10.3390/pathogens5010030.
- SPILF. 2015. Mise au point- Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires de l'adulte. SPILF. Available from <http://www.infectiologie.com/> [accessed 13 March 2016].
- Stein, R., Dogan, H.S., Hoebeke, P., Kočvara, R., Nijman, R.J.M., Radmayr, C., Tekgül, S., European Association of Urology, and European Society for Pediatric Urology. 2015. Urinary tract infections in children: EAU/ESPU guidelines. *Eur. Urol.* **67**(3): 546–558. doi:10.1016/j.eururo.2014.11.007.
- Subashchandrabose, S., and Mobley, H.L.T. 2015a. Back to the metal age: battle for metals at the host-pathogen interface during urinary tract infection. *Met. Integr. Biometal Sci.* **7**(6): 935–942. doi:10.1039/c4mt00329b.
- Subashchandrabose, S., and Mobley, H.L.T. 2015b. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* **3**(4). doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012.
- Sundén, F., Håkansson, L., Ljunggren, E., and Wullt, B. 2006. Bacterial interference—is deliberate colonization with *Escherichia coli* 83972 an alternative treatment for patients with recurrent urinary tract infection? *Int. J. Antimicrob. Agents* **28**, **Supplement 1**: 26–29. doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.05.007.
- Sundén, F., Håkansson, L., Ljunggren, E., and Wullt, B. 2010. *Escherichia coli* 83972 Bacteriuria Protects Against Recurrent Lower Urinary Tract Infections in Patients With Incomplete Bladder Emptying. *J. Urol.* **184**(1): 179–185. doi:10.1016/j.juro.2010.03.024.
- Szasz, T., Wenceslau, C.F., Burgess, B., Nunes, K.P., and Webb, R.C. 2016. Toll-Like Receptor 4 Activation Contributes to Diabetic Bladder Dysfunction in a Murine Model of Type 1 Diabetes. *Diabetes* **65**(12): 3754–3764. doi:10.2337/db16-0480.
- Tabasi, M., Karam, M.R.A., Habibi, M., Mostafavi, E., and Bouzari, S. 2016. Genotypic Characterization of Virulence Factors in *Escherichia coli* Isolated from Patients with Acute Cystitis,

- Pyelonephritis and Asymptomatic Bacteriuria. *J. Clin. Diagn. Res.* **10**(12): DC01–DC07. doi:10.7860/JCDR/2016/21379.9009.
- Taieb, F., Petit, C., Nougayrède, J.-P., and Oswald, E. 2016. The Enterobacterial Genotoxins: Cytolethal Distending Toxin and Colibactin. *EcoSal Plus* **7**(1). doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0008-2016.
- Taieb, F., Sváb, D., Watrin, C., Oswald, E., and Tóth, I. 2015. Cytolethal distending toxin A, B and C subunit proteins are necessary for the genotoxic effect of *Escherichia coli* CDT-V. *Acta Vet. Hung.* **63**(1): 1–10. Akadémiai Kiadó. doi:10.1556/avet.2015.001.
- Tang-Fichaux, M., Chagneau, C.V., Bossuet-Greif, N., Nougayrède, J.-P., Oswald, É., and Branchu, P. 2020. The Polyphosphate Kinase of *Escherichia coli* Is Required for Full Production of the Genotoxin Colibactin. *mSphere* **5**(6). doi:10.1128/mSphere.01195-20.
- Tarchouna, M., Ferjani, A., Ben-Selma, W., and Boukadida, J. 2013. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Int. J. Infect. Dis.* **17**(6): e450–e453. doi:10.1016/j.ijid.2013.01.025.
- Terlouw, D., Suerink, M., Boot, A., van Wezel, T., Nielsen, M., and Morreau, H. 2020. Recurrent APC Splice Variant c.835-8A>G in Patients With Unexplained Colorectal Polyposis Fulfilling the Colibactin Mutational Signature. *Gastroenterology* **159**(4): 1612-1614.e5. doi:10.1053/j.gastro.2020.06.055.
- Thomas-White, K., Forster, S.C., Kumar, N., Van Kuiken, M., Putonti, C., Stares, M.D., Hilt, E.E., Price, T.K., Wolfe, A.J., and Lawley, T.D. 2018. Culturing of female bladder bacteria reveals an interconnected urogenital microbiota. *Nat. Commun.* **9**. doi:10.1038/s41467-018-03968-5.
- Tolg, C. 2011. Uropathogenic *E. coli* infection provokes epigenetic downregulation of CDKN2A (p16INK4A) in uroepithelial cells. *Lab. Invest.* **91**: 12.
- Tomkovich, S., Yang, Y., Winglee, K., Gauthier, J., Mühlbauer, M., Sun, X., Mohamadzadeh, M., Liu, X., Martin, P., Wang, G.P., Oswald, E., Fodor, A.A., and Jobin, C. 2017. Locoregional Effects of Microbiota in a Preclinical Model of Colon Carcinogenesis. *Cancer Res.* **77**(10): 2620–2632. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-3472.
- Trautman, E.P., Healy, A.R., Shine, E.E., Herzon, S.B., and Crawford, J.M. 2017. Domain-Targeted Metabolomics Delineates the Heterocycle Assembly Steps of Colibactin Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **139**(11): 4195–4201. doi:10.1021/jacs.7b00659.
- Tripathi, P., and Bruner, S.D. 2021. Structural Basis for the Interactions of the Colibactin Resistance Gene Product ClbS with DNA. *Biochemistry* **60**(20): 1619–1625. American Chemical Society. doi:10.1021/acs.biochem.1c00201.
- Tripathi, P., Shine, E.E., Healy, A.R., Kim, C.S., Herzon, S.B., Bruner, S.D., and Crawford, J.M. 2017. ClbS Is a Cyclopropane Hydrolase That Confers Colibactin Resistance. *J. Am. Chem. Soc.* **139**(49): 17719–17722. doi:10.1021/jacs.7b09971.
- Tronnet, S., Floch, P., Lucarelli, L., Gaillard, D., Martin, P., Serino, M., and Oswald, E. 2020. The Genotoxin Colibactin Shapes Gut Microbiota in Mice. *mSphere* **5**(4). American Society for Microbiology Journals. doi:10.1128/mSphere.00589-20.
- Tronnet, S., Garcie, C., Brachmann, A.O., Piel, J., Oswald, E., and Martin, P. 2017. High iron supply inhibits the synthesis of the genotoxin colibactin by pathogenic *Escherichia coli* through a non-canonical Fur/RyhB-mediated pathway. *Pathog. Dis.* **75**(5). doi:10.1093/femspd/ftx066.
- Tronnet, S., Garcie, C., Rehm, N., Dobrindt, U., Oswald, E., and Martin, P. 2016. Iron homeostasis regulates the genotoxicity of *Escherichia coli* that produces colibactin. *Infect. Immun.* **84**(12): 3358–3368. doi:10.1128/IAI.00659-16.
- Vassiliadis, G., Destoumieux-Garzón, D., Lombard, C., Rebuffat, S., and Peduzzi, J. 2010. Isolation and Characterization of Two Members of the Siderophore-Microcin Family, Microcins M and H47. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**(1): 288–297. doi:10.1128/AAC.00744-09.
- Vermeulen, S.H., Hanum, N., Grotenhuis, A.J., Castañó-Vinyals, G., van der Heijden, A.G., Aben, K.K., Mysorekar, I.U., and Kiemeneij, L.A. 2015. Recurrent urinary tract infection and risk of bladder cancer in the Nijmegen bladder cancer study. *Br. J. Cancer* **112**(3): 594–600. doi:10.1038/bjc.2014.601.

- Vizcaino, M.I., and Crawford, J.M. 2015. The colibactin warhead crosslinks DNA. *Nat. Chem.* **7**(5): 411–417. doi:10.1038/nchem.2221.
- Vizcaino, M.I., Engel, P., Trautman, E., and Crawford, J.M. 2014. Comparative metabolomics and structural characterizations illuminate colibactin pathway-dependent small molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **136**(26): 9244–9247. doi:10.1021/ja503450q.
- Volkmer, J.-P., Sahoo, D., Chin, R.K., Ho, P.L., Tang, C., Kurtova, A.V., Willingham, S.B., Pazhanisamy, S.K., Contreras-Trujillo, H., Storm, T.A., Lotan, Y., Beck, A.H., Chung, B.I., Alizadeh, A.A., Godoy, G., Lerner, S.P., van de Rijn, M., Shortliffe, L.D., Weissman, I.L., and Chan, K.S. 2012. Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**(6): 2078–2083. doi:10.1073/pnas.1120605109.
- Volpe, M.R., Wilson, M.R., Brotherton, C.A., Winter, E.S., Johnson, S.E., and Balskus, E.P. 2019. In Vitro Characterization of the Colibactin-Activating Peptidase ClbP Enables Development of a Fluorogenic Activity Probe. *ACS Chem. Biol.* **14**(6): 1097–1101. American Chemical Society. doi:10.1021/acscchembio.9b00069.
- Wadachi, R., and Hargreaves, K.M. 2006. Trigeminal Nociceptors Express TLR-4 and CD14: a Mechanism for Pain due to Infection. *J. Dent. Res.* **85**(1): 49–53.
- Waksman, G., and Hultgren, S.J. 2009. Structural biology of the chaperone–usher pathway of pilus biogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**(11): 765–774. doi:10.1038/nrmicro2220.
- Waldhuber, A., Puthia, M., Wieser, A., Cirl, C., Dürr, S., Neumann-Pfeifer, S., Albrecht, S., Römmler, F., Müller, T., Zheng, Y., Schubert, S., Groß, O., Svanborg, C., and Miethke, T. 2016. Uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 disrupts NLRP3 inflammasome activation. *J. Clin. Invest.* **126**(7): 2425–2436. doi:10.1172/JCI81916.
- Wallenstein, A., Rehm, N., Brinkmann, M., Selle, M., Bossuet-Greif, N., Sauer, D., Bunk, B., Spröer, C., Wami, H.T., Homburg, S., von Büнау, R., König, S., Nougayrède, J.-P., Overmann, J., Oswald, E., Müller, R., and Dobrindt, U. 2020. ClbR Is the Key Transcriptional Activator of Colibactin Gene Expression in *Escherichia coli*. *mSphere* **5**(4). doi:10.1128/mSphere.00591-20.
- Walsh, C.T. 2016. Insights into the chemical logic and enzymatic machinery of NRPS assembly lines. *Nat. Prod. Rep.* **33**(2): 127–135. doi:10.1039/C5NP00035A.
- Walsh, C.T., and Fischbach, M.A. 2010. Natural Products Version 2.0: Connecting Genes to Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **132**(8): 2469–2493. doi:10.1021/ja909118a.
- Wami, H., Wallenstein, A., Sauer, D., Stoll, M., von Büнау, R., Oswald, E., Müller, R., and Dobrindt, U. 2021. Insights into evolution and coexistence of the colibactin- and yersiniabactin secondary metabolite determinants in enterobacterial populations. *Microb. Genomics* **7**(6). doi:10.1099/mgen.0.000577.
- Wang, C., Ross, W.T., and Mysorekar, I.U. 2017. Urothelial Generation and Regeneration in Development, Injury, and Cancer. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **246**(4): 336–343. doi:10.1002/dvdy.24487.
- Wang, H., Fewer, D.P., Holm, L., Rouhiainen, L., and Sivonen, K. 2014a. Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**(25): 9259–9264. doi:10.1073/pnas.1401734111.
- Wang, J., Batourina, E., Schneider, K., Souza, S., Swayne, T., Liu, C., George, C.D., Tate, T., Dan, H., Wiessner, G., Zhuravlev, Y., Canman, J.C., Mysorekar, I.U., and Mendelsohn, C.L. 2018. Polyploid Superficial Cells that Maintain the Urothelial Barrier Are Produced via Incomplete Cytokinesis and Endoreplication. *Cell Rep.* **25**(2): 464–477.e4. doi:10.1016/j.celrep.2018.09.042.
- Wang, Y., Zhao, S., Han, L., Guo, X., Chen, M., Ni, Y., Zhang, Y., Cui, Z., and He, P. 2014b. Drug resistance and virulence of uropathogenic *Escherichia coli* from Shanghai, China. *J. Antibiot. (Tokyo)* **67**(12): 799–805. doi:10.1038/ja.2014.72.
- Wang, Z.-Y., Wang, P., Merriam, F.V., and Bjorling, D.E. 2008. Lack of TRPV1 inhibits cystitis-induced increased mechanical sensitivity in mice: *Pain* **139**(1): 158–167. doi:10.1016/j.pain.2008.03.020.

- Watts, R.E., Totsika, M., Challinor, V.L., Mabbett, A.N., Ulett, G.C., De Voss, J.J., and Schembri, M.A. 2012. Contribution of siderophore systems to growth and urinary tract colonization of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **80**(1): 333–344. doi:10.1128/IAI.05594-11.
- Welch, R.A. 2016. Uropathogenic *Escherichia coli*-Associated Exotoxins. *Microbiol. Spectr.* **4**(3). doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0011-2012.
- Whiteside, S.A., Razvi, H., Dave, S., Reid, G., and Burton, J.P. 2015. The microbiome of the urinary tract—a role beyond infection. *Nat. Rev. Urol.* **12**(2): 81–90. doi:10.1038/nrurol.2014.361.
- Willner, D., Low, S., Steen, J.A., George, N., Nimmo, G.R., Schembri, M.A., and Hugenholtz, P. 2014. Single Clinical Isolates from Acute Uncomplicated Urinary Tract Infections Are Representative of Dominant In Situ Populations. *mBio* **5**(2): e01064-13. doi:10.1128/mBio.01064-13.
- Wilson, M.R., Jiang, Y., Villalta, P.W., Stornetta, A., Boudreau, P.D., Carrá, A., Brennan, C.A., Chun, E., Ngo, L., Samson, L.D., Engelward, B.P., Garrett, W.S., Balbo, S., and Balskus, E.P. 2019. The human gut bacterial genotoxin colibactin alkylates DNA. *Science* **363**(6428): eaar7785. doi:10.1126/science.aar7785.
- Wirbel, J., Pyl, P.T., Kartal, E., Zych, K., Kashani, A., Milanese, A., Fleck, J.S., Voigt, A.Y., Palleja, A., Ponnudurai, R., Sunagawa, S., Coelho, L.P., Schrotz-King, P., Vogtmann, E., Habermann, N., Niméus, E., Thomas, A.M., Manghi, P., Gandini, S., Serrano, D., Mizutani, S., Shiroma, H., Shiba, S., Shibata, T., Yachida, S., Yamada, T., Waldron, L., Naccarati, A., Segata, N., Sinha, R., Ulrich, C.M., Brenner, H., Arumugam, M., Bork, P., and Zeller, G. 2019. Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer. *Nat. Med.* **25**(4): 679–689. doi:10.1038/s41591-019-0406-6.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C., Ochman, H., and Achtman, M. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* **60**(5): 1136–1151. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x.
- Wolfe, A.J., Toh, E., Shibata, N., Rong, R., Kenton, K., FitzGerald, M., Mueller, E.R., Schreckenberger, P., Dong, Q., Nelson, D.E., and Brubaker, L. 2012. Evidence of Uncultivated Bacteria in the Adult Female Bladder. *J. Clin. Microbiol.* **50**(4): 1376–1383. doi:10.1128/JCM.05852-11.
- Wullt, B., and Svanborg, C. 2016. Deliberate Establishment of Asymptomatic Bacteriuria—A Novel Strategy to Prevent Recurrent UTI. *Pathog. Basel Switz.* **5**(3). doi:10.3390/pathogens5030052.
- Wurpel, D.J., Totsika, M., Allsopp, L.P., Hartley-Tassell, L.E., Day, C.J., Peters, K.M., Sarkar, S., Ulett, G.C., Yang, J., Tiralongo, J., Strugnell, R.A., Jennings, M.P., and Schembri, M.A. 2014. F9 Fimbriae of Uropathogenic *Escherichia coli* Are Expressed at Low Temperature and Recognise Gal $\beta$ 1-3GlcNAc-Containing Glycans. *PLOS ONE* **9**(3): e93177. Public Library of Science. doi:10.1371/journal.pone.0093177.
- Xue, M., Kim, C.S., Healy, A.R., Wernke, K.M., Wang, Z., Frischling, M.C., Shine, E.E., Wang, W., Herzon, S.B., and Crawford, J.M. 2019. Structure elucidation of colibactin and its DNA cross-links. *Science*: eaax2685. doi:10.1126/science.aax2685.
- Xue, M., Shine, E., Wang, W., Crawford, J.M., and Herzon, S.B. 2018. Characterization of natural colibactin–nucleobase adducts by tandem mass spectrometry and isotopic labeling. Support for DNA alkylation by cyclopropane ring opening. *Biochemistry* **57**(45): 6391–6394. doi:10.1021/acs.biochem.8b01023.
- Xue, M., Wernke, K., and Herzon, S.B. 2020. Depurination of colibactin-derived interstrand cross-links. *Biochemistry*. doi:10.1021/acs.biochem.9b01070.
- Yamamoto, S., Nakano, M., Terai, A., Yuri, K., Nakata, K., Nair, G.B., Kurazono, H., and Ogawa, O. 2001. The presence of the virulence island containing the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model. *J. Urol.* **165**(4): 1347–1351.
- Yang, Y., Gharaibeh, R.Z., Newsome, R.C., and Jobin, C. 2020. Amending microbiota by targeting intestinal inflammation with TNF blockade attenuates development of colorectal cancer. *Nat. Cancer* **1**(7): 723–734. doi:10.1038/s43018-020-0078-7.

- Yuk, H.D., Jeong, C.W., Kwak, C., Kim, H.H., Moon, K.C., and Ku, J.H. 2019. Clinical outcomes of muscle invasive bladder Cancer according to the BASQ classification. *BMC Cancer* **19**(1): 897. doi:10.1186/s12885-019-6042-1.
- Zakour, N.L.B., Alsheikh-Hussain, A.S., Ashcroft, M.M., Nhu, N.T.K., Roberts, L.W., Stanton-Cook, M., Schembri, M.A., and Beatson, S.A. 2016. Sequential Acquisition of Virulence and Fluoroquinolone Resistance Has Shaped the Evolution of *Escherichia coli* ST131. *mBio* **7**(2). American Society for Microbiology. doi:10.1128/mBio.00347-16.
- Zaw, M.T., Yamasaki, E., Yamamoto, S., Nair, G.B., Kawamoto, K., and Kurazono, H. 2013. Uropathogenic specific protein gene, highly distributed in extraintestinal uropathogenic *Escherichia coli*, encodes a new member of HNH nuclease superfamily. *Gut Pathog.* **5**(1): 1. doi:10.1186/1757-4749-5-13.
- Zdziarski, J., Brzuszkiewicz, E., Wullt, B., Liesegang, H., Biran, D., Voigt, B., Grönberg-Hernandez, J., Ragnarsdottir, B., Hecker, M., Ron, E.Z., Daniel, R., Gottschalk, G., Hacker, J., Svanborg, C., and Dobrindt, U. 2010. Host Imprints on Bacterial Genomes—Rapid, Divergent Evolution in Individual Patients. *PLoS Pathog.* **6**(8). doi:10.1371/journal.ppat.1001078.
- Zdziarski, J., Svanborg, C., Wullt, B., Hacker, J., and Dobrindt, U. 2008. Molecular basis of commensalism in the urinary tract: low virulence or virulence attenuation? *Infect. Immun.* **76**(2): 695–703. doi:10.1128/IAI.01215-07.
- Zeman, M.K., and Cimprich, K.A. 2014. Causes and Consequences of Replication Stress. *Nat. Cell Biol.* **16**(1): 2–9. doi:10.1038/ncb2897.
- Zha, L., Jiang, Y., Henke, M.T., Wilson, M.R., Wang, J.X., Kelleher, N.L., and Balskus, E.P. 2017. Colibactin assembly line enzymes use S-adenosylmethionine to build a cyclopropane ring. *Nat. Chem. Biol.* **13**(10): 1063–1065. doi:10.1038/nchembio.2448.
- Zha, L., Wilson, M.R., Brotherton, C.A., and Balskus, E.P. 2016. Characterization of polyketide synthase machinery from the pks island facilitates isolation of a candidate precolibactin. *ACS Chem. Biol.* **11**(5): 1287–1295. doi:10.1021/acscchembio.6b00014.
- Zhao, L., Chen, X., Zhu, X., Yang, W., Dong, L., Xu, X., Gao, S., and Liu, X. 2009. Prevalence of virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Jiangsu province (China). *Urology* **74**(3): 702–707. doi:10.1016/j.urology.2009.01.042.
- Zhou, T., Hirayama, Y., Tsunematsu, Y., Suzuki, N., Tanaka, S., Uchiyama, N., Goda, Y., Yoshikawa, Y., Iwashita, Y., Sato, M., Miyoshi, N., Mutoh, M., Ishikawa, H., Sugimura, H., Wakabayashi, K., and Watanabe, K. 2021. Isolation of New Colibactin Metabolites from Wild-Type *Escherichia coli* and In Situ Trapping of a Mature Colibactin Derivative. *J. Am. Chem. Soc.* **143**(14): 5526–5533. American Chemical Society. doi:10.1021/jacs.1c01495.

# Annexes

## Liste des autres publications

**Chagneau, Camille V.**, Christophe Garcie, Nadège Bossuet-Greif, Sophie Tronnet, Alexander O. Brachmann, Jörn Piel, Jean-Philippe Nougayrède, Patricia Martin, and Eric Oswald. 'The Polyamine Spermidine Modulates the Production of the Bacterial Genotoxin Colibactin'. *MSphere* 4, no. 5 (30 October 2019): e00414-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00414-19>.

Massip, Clémence, Priscilla Branchu, Nadège Bossuet-Greif, **Camille V. Chagneau**, Déborah Gaillard, Patricia Martin, Michèle Boury, et al. 'Deciphering the Interplay between the Genotoxic and Probiotic Activities of Escherichia Coli Nissle 1917'. *PLOS Pathogens* 15, no. 9 (23 September 2019): e1008029. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008029>.

Nougayrède, Jean-Philippe, **Camille V. Chagneau**, Jean-Paul Motta, Nadège Bossuet-Greif, Marcy Belloy, Frédéric Taieb, Jean-Jacques Gratadoux, Muriel Thomas, Philippe Langella, and Eric Oswald. 'A Toxic Friend: Genotoxic and Mutagenic Activity of the Probiotic Strain Escherichia Coli Nissle 1917'. *MSphere*, 11 August 2021, e0062421. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00624-21>.

Tang-Fichaux, Min, **Camille V. Chagneau**, Nadège Bossuet-Greif, Jean-Philippe Nougayrède, Éric Oswald, and Priscilla Branchu. 'The Polyphosphate Kinase of Escherichia Coli Is Required for Full Production of the Genotoxin Colibactin'. *MSphere* 5, no. 6 (23 December 2020). <https://doi.org/10.1128/mSphere.01195-20>.

Auvray, Frédéric, Alexandre Perrat, Yoko Arimizu, **Camille V. Chagneau**, Nadège Bossuet-Greif, Clémence Massip, Hubert Brugère, et al. 'Insights into the Acquisition of the Pks Island and Production of Colibactin in the Escherichia Coli Population'. *Microbial Genomics* 7, no. 5 (May 2021). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000579>.



**Camille Chagneau**

Etude de la colibactine dans les infections urinaires

**Résumé :**

Les infections urinaires (UTI) sont parmi les infections bactériennes communautaires ou nosocomiales les plus fréquentes. Elles sont le plus souvent causées par des *Escherichia coli* uropathogènes (UPEC). Nous avons constitué une collection d'UPEC issus de 223 patients souffrants d'UTI communautaires afin de comprendre le rôle et l'impact de potentiels facteurs de virulence des UPEC jusque-là peu étudiés. En particulier nous avons montré que 43% des UPEC portaient un îlot de pathogénicité, l'îlot *pks*. Il code pour une machinerie de synthèse de différents métabolites secondaires dont une génotoxine, la colibactine. Chez les *E. coli* commensales intestinales, la colibactine est suspectée de promouvoir le cancer colorectal. Mon objectif a été d'étudier l'impact et le rôle de l'îlot *pks* et de ses métabolites dans la physiopathologie des UTI. Nous avons montré que la machinerie de biosynthèse *pks* était active chez l'Homme durant l'UTI. Nous avons ainsi retrouvé pour la première fois un métabolite témoin de la production de la colibactine dans plus de la moitié des urines des patients atteints d'une UTI à UPEC *pks+*. Ces isolats cliniques d'UPEC *pks+* sont génotoxiques *in vitro*. En reproduisant une UTI en modèle murin, nous avons démontré l'expression de la machinerie *pks* dans les communautés bactériennes intracellulaires formées dans les cellules vésicales et nous avons mis en évidence la présence de dommages à l'ADN dans les cellules urothéliales liés à la production de colibactine. Ces dommages surviennent y compris dans des cellules KRT14+ progénitrices de la vessie. Cette étude suggère que les UTI pourraient par ce biais avoir des conséquences à plus long terme sur l'hôte, en particulier dans le cancer de la vessie. En perspective, il convient également de questionner l'actuelle recommandation d'absence de traitement des bactériuries asymptomatiques, qui peuvent ainsi persister des mois voire des années alors qu'elles sont causées par des souches fréquemment porteuses de l'îlot *pks* et génotoxiques.

**Mots clés :** infections urinaires, *Escherichia coli* uropathogènes, îlot *pks*, colibactine, métabolites secondaires

**Summary :**

Urinary tract infections (UTIs) are among the most common community-acquired or nosocomial bacterial infections. They are most often caused by uropathogenic *Escherichia coli* (UPECs). We assembled a collection of UPECs from 223 patients suffering from community-acquired UTIs in order to understand the role and impact of potential virulence factors of UPECs that have been little studied until now. In particular, we showed that 43% of UPECs carried a pathogenicity island, the *pks* island. It encodes a machinery for the synthesis of various secondary metabolites including a genotoxin, colibactin. In commensal intestinal *E. coli*, colibactin is suspected of promoting colorectal cancer. My aim was to study the impact and role of the *pks* island and its metabolites in the pathophysiology of UTIs. We have shown that the *pks* biosynthesis machinery is active in humans during UTI. For the first time, we found a marker metabolite for colibactin production in more than half of the urine of patients with *pks+* UPEC UTIs. These clinical isolates of *pks+* UPECs are genotoxic *in vitro*. By reproducing UTI in a mouse model, we demonstrated the expression of the *pks* machinery in intracellular bacterial communities formed in bladder cells and demonstrated the presence of DNA damage in urothelial cells related to colibactin production. This damage occurs even in KRT14+ progenitor cells of the bladder. This study suggests that UTIs may have longer-term consequences for the host, particularly in bladder cancer. In perspective, it seems also appropriate to question the current recommendation of no treatment for asymptomatic bacteriuria, which can persist for months or even years even though they are caused by strains that frequently carry the *pks* island and are genotoxic.

**Keywords:** urinary tract infections, uropathogenic *Escherichia coli*, *pks* island, colibactin, secondary metabolites

