



**HAL**  
open science

**Étude de nouveaux facteurs de pathogénicité de  
Klebsiella pneumoniae : caractérisation du fimbriae de  
type “ chaperone-usher ” Kpg et de la pompe à efflux  
MdtJI**

Laura Joseph

► **To cite this version:**

Laura Joseph. Étude de nouveaux facteurs de pathogénicité de *Klebsiella pneumoniae* : caractérisation du fimbriae de type “ chaperone-usher ” Kpg et de la pompe à efflux MdtJI. Microbiologie et Parasitologie. Université Clermont Auvergne, 2022. Français. NNT : 2022UCFAC041 . tel-03998849

**HAL Id: tel-03998849**

**<https://theses.hal.science/tel-03998849v1>**

Submitted on 21 Feb 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.

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES  
DE LA VIE ET DE LA SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

*Thèse*

Présentée à l'Université Clermont Auvergne  
Pour l'obtention du grade de DOCTEUR

(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : **Microbiologie**

Soutenue le 22 juillet 2022

par

**Laura JOSEPH**

---

Étude de nouveaux facteurs de pathogénicité de  
*Klebsiella pneumoniae* : caractérisation du fimbriae de type  
« chaperone-usher » Kpg et de la pompe à efflux MdtJI

---

Président : Dr Régine TALON, INRAE UMR454 Medis, Clermont-Ferrand Theix

Rapporteurs : Dr Sandra DA RE, INSERN UMR1092, Limoges  
Dr Sylvie NAZARET, CNRS UMR5557, Lyon  
Pr Jean-Philippe LAVIGNE, Université de Montpellier, Montpellier

Membre : Dr Guillaume DALMASSO, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand

Directeur de thèse : Dr Damien BALESTRINO, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, UMR CNRS 6023  
Université Clermont Auvergne, 28 Place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand

## Abbreviations

<b>ABC</b>	ATP-Binding Cassette	<b>KO</b>	Knock out
<b>AHL</b>	Acyl-Homoserine Lactone	<b>LCA</b>	Lithocholic acid
<b>AI</b>	Autoinducteur	<b>Lcn-2</b>	Lipocalin-2
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate	<b>LPS</b>	Lipopolysaccharides
<b>BALF</b>	Bronchoalveolar Liquid Fluid	<b>MATE</b>	Multidrug And Toxic-compound Extrusion
<b>c-di-GMP</b>	Cyclic di-guanosine monophosphate	<b>MCL</b>	Lipid-core micelles
<b>CAP</b>	Community Acquired Pneumonia	<b>MDR</b>	Multidrug resistance
<b>CAUTI</b>	Catheter-Associated Urinary Tract Infection	<b>MFP</b>	Membrane Fusion Protein
<b>CFU</b>	Colony Forming Unit	<b>MFS</b>	Major Facilitator Superfamily
<b>cKp</b>	Classique <i>K. pneumoniae</i>	<b>Nte</b>	Extrémité N-terminale
<b>CR-Kp</b>	Carbapenem-resistant <i>K. pneumoniae</i>	<b>NTD</b>	N-terminal domain
<b>CTD1</b>	C-terminal Domain 1	<b>OMF</b>	Outer Membrane Factor
<b>CTD2</b>	C-terminal Domain 2	<b>OMP</b>	Outer Membrane Protein
<b>CU</b>	Chaperone-Usher	<b>PBP</b>	Penicilin Binding Protein
<b>DCA</b>	Deoxycholic acid	<b>PDE</b>	Phosphodiesterases
<b>DGC</b>	Diguanylates cyclases	<b>PMN</b>	Polymorphonuclear cells
<b>DSS</b>	Dextran Sulfate Sodium	<b>PNP</b>	Polymeric nanoparticles
<b>ECA</b>	Enterobacterial Common Antigen	<b>PPMO</b>	Phosphorodiamidate morpholino oligomers
<b>Ent</b>	Enterobactin	<b>PSMR</b>	Paired Small Multidrug Resistance
<b>EPS</b>	Exopolysaccharide	<b>QAC</b>	Quaternary Ammonium Compound
<b>ESBL</b>	Extended spectrum $\beta$ -lactamase	<b>QS</b>	Quorum Sensing
<b>EV</b>	Extracellular vesicule	<b>RND</b>	Resistance Nodulation Division
<b>FGL</b>	FG-loop Long	<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Specie
<b>FGS</b>	FG-loop Short	<b>Sal</b>	Salmocheilin
<b>GF</b>	Germ-free	<b>SBA</b>	Secondary bile acid
<b>GI</b>	Gastrointestinal	<b>SMR</b>	Small Multidrug Resistance
<b>HAP</b>	Hopital Acquired Pneumonia	<b>STM</b>	Signature-tagged mutagenesis
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hypoxia-Inductible Factor-1 $\alpha$	<b>TRUC</b>	<i>Il10<sup>-/-</sup> T-bet<sup>-/-</sup> Rag2<sup>-/-</sup></i> ulcerative colitis
<b>hvKp</b>	Hypervirulent <i>K. pneumoniae</i>	<b>UPEC</b>	Uropathogenic Escherichia coli
<b>INseq</b>	Insertion sequencing	<b>UTI</b>	Urinary Tract Infection
		<b>Ybt</b>	Yersiniabactin

## Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>Introduction bibliographique .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Généralités sur <i>Klebsiella pneumoniae</i>.....</b>	<b>3</b>
1.1. Taxonomie et phylogénie du genre <i>Klebsiella</i> .....	3
1.2. Écologie .....	4
1.3. Épidémiologie et infections hospitalières.....	5
1.4. Caractéristiques des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	6
<b>2. La colonisation des surfaces par <i>K. pneumoniae</i> .....</b>	<b>8</b>
2.1. L'adhésion bactérienne .....	8
2.2. Définition d'un biofilm.....	10
2.3. Avantages du mode de vie sessile .....	11
2.4. Structure et composition du biofilm .....	12
2.5. Les étapes de développement du biofilm .....	13
2.5.1. L'adhésion.....	14
2.5.2. La maturation .....	15
2.5.3. L'étape de dispersion.....	16
2.6. Facteurs d'adhésion et de formation du biofilm .....	17
<b>3. Les fimbriae de type chaperone-usher.....</b>	<b>18</b>
3.1. Architecture générale et composants des fimbriae CU.....	18
3.2. Classification des systèmes chaperone-usher .....	19
3.3. Organisation génomique et diversité des systèmes CU .....	21
3.4. Mécanismes d'assemblage des fimbriae de la voie CU .....	22
3.4.1. Stabilisation des sous-unités par « complémentation du brin donneur ».....	23
3.4.2. Assemblage des sous-unités par « échange du brin donneur » .....	24
3.4.3. Ordre d'assemblage des sous-unité fimbriales.....	25
3.5. Fonctionnalité des fimbriae.....	26
3.6. Les systèmes fimbriaux n'appartenant pas à la voie CU .....	27
<b>4. Les déterminants de la résistance : les pompes à efflux.....</b>	<b>28</b>
4.1. Stress environnementaux et mécanismes de résistance.....	28
4.2. Généralités sur les pompes à efflux .....	31
4.3. Les familles de pompes à efflux.....	32
4.3.1. La famille ATP Binding Cassette (ABC) .....	32
4.3.2. La famille Major Facilitator Superfamily (MFS).....	34
4.3.3. La famille Multidrug And Toxic-compound Extrusion (MATE).....	34
4.3.4. La famille Resistance-Nodulation-cell Division (RND).....	36
4.3.5. La famille Small Multidrug Resistance (SMR).....	37
4.4. La spécificité des substrats des pompes à efflux .....	39
4.5. Les fonctions des pompes à efflux.....	40
4.5.1. La résistance aux composés toxiques .....	40
4.5.2. La communication intercellulaire ou quorum sensing.....	41
4.5.3. La formation de biofilm .....	42
4.5.4. La virulence.....	43
4.6. Les pompes à efflux chez <i>K. pneumoniae</i> .....	44
<b>5. La virulence bactérienne .....</b>	<b>45</b>
<b>Publication n°1 (voir également annexe 1).....</b>	<b>47</b>

5.1.	Intestinal colonization .....	50
5.1.1.	Colonization resistance of the intestinal microbiota to <i>K. pneumoniae</i> .....	51
5.1.2.	<i>K. pneumoniae</i> colonization factors .....	53
5.2.	Systemic infections .....	56
5.2.1.	Spreading from the intestinal tract .....	57
5.2.2.	Spreading from extraintestinal sites .....	58
5.3.	Pulmonary infections .....	61
5.3.1.	<i>In vivo</i> models .....	61
5.3.2.	<i>K. pneumoniae</i> pulmonary virulence factors .....	63
5.3.3.	<i>K. pneumoniae</i> in the lungs: host immune and microbiota responses .....	66
5.4.	Urinary tract infection .....	68
5.5.	Role of animal models in the development of new therapies against <i>K. pneumoniae</i> infections... 71	
5.5.1.	Animal models to assess the efficacy of natural or chemical agents .....	71
5.5.2.	Animal models with controlled intestinal microbiota .....	73
5.5.3.	Immunized animal model mimicking the vaccination processes .....	73
<b>Partie expérimentale .....</b>		<b>76</b>
	Rôle du fimbriae Kpg de type « chaperone-usher » de <i>K. pneumoniae</i> : avant-propos .....	76
<b>Publication n°2 (non publiée).....</b>		<b>77</b>
<b>Données complémentaires .....</b>		<b>102</b>
	Rôle de la pompe à efflux MdtJI de <i>K. pneumoniae</i> : avant-propos .....	103
<b>Discussion générale et perspectives .....</b>		<b>112</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>		<b>121</b>
<b>Annexes .....</b>		<b>133</b>

## Figures et tableaux

Figure 1 : <b>Classifications des espèces du genre <i>Klebsiella</i></b> .....	page 3
Figure 2 : <b>Représentation de la position taxonomique de <i>Klebsiella pneumoniae</i></b> .....	page 3
Figure 3 : <b>Propriétés spécifiques d'un biofilm bactérien</b> .....	page 11
Figure 4 : <b>Représentation schématique de l'architecture d'un biofilm mature</b> .....	page 12
Figure 5 : <b>Représentation schématique du rôle des « persisters » dans la résilience des biofilms</b> .....	page 13
Figure 6 : <b>Représentation schématique des différentes étapes du développement d'un biofilm</b> .....	page 13
Figure 7 : <b>Principales interactions bactéries/surface impliquées dans l'adhésion</b> .....	page 14
Figure 8 : <b>Signaux et mécanismes impliqués dans le processus de dispersion</b> .....	page 16
Figure 9 : <b>Représentation générale des fimbriae de type CU</b> .....	page 18
Figure 10 : <b>Arbre phylogénétique et classification des différentes familles de fimbriae CU</b> .....	page 20
Figure 11 : <b>Mécanisme de complémentation du brin donneur</b> .....	page 23
Figure 12 : <b>Structure de la protéine usher FimD du fimbriae de type 1 en phase inactive et active</b> .....	page 24
Figure 13 : <b>Mécanisme d'échange du brin donneur</b> .....	page 24
Figure 14 : <b>Représentation topologique du mécanisme d'échange du brin donneur</b> .....	page 24
Figure 15 : <b>Structure du complexe usher-chaperone-adhésine</b> .....	page 24
Figure 16 : <b>Représentation schématique de la voie d'assemblage alternative</b> .....	page 27
Figure 17 : <b>Représentation schématique des voies d'assemblage des curli et des fimbriae de type IV</b> ..	page 27
Figure 18 : <b>Représentation schématique des mécanismes de résistance aux antibiotiques</b> .....	page 30
Figure 19 : <b>Représentation schématique des sources d'énergie des pompes à efflux</b> .....	page 32
Figure 20 : <b>Représentation des cinq superfamilles de pompes à efflux</b> .....	page 32
Figure 21 : <b>Représentation schématique de la structure des 5 familles de pompes à efflux</b> .....	page 32
Figure 22 : <b>Modèle de la structure des pompes à efflux de la superfamille ABC</b> .....	page 33
Figure 23 : <b>Représentation du mécanisme de transport d'une pompe de la famille ABC</b> .....	page 33
Figure 24 : <b>Modèle de la structure des pompes à efflux de la famille MFS</b> .....	page 34
Figure 25 : <b>Représentation du mécanisme de transport d'une pompe de la famille MFS</b> .....	page 34
Figure 26 : <b>Représentation de la structure des pompes à efflux de la famille MATE</b> .....	page 35
Figure 27 : <b>Représentation d'un mécanisme de transport d'une pompe à efflux eMATE</b> .....	page 35
Figure 28 : <b>Représentation d'un mécanisme de transport d'une pompe à efflux DinF</b> .....	page 35
Figure 29 : <b>Représentation schématique d'une pompe à efflux de la famille RND</b> .....	page 36
Figure 30 : <b>Modèle de la structure des pompes à efflux de la famille RND</b> .....	page 36
Figure 31 : <b>Représentation en ruban d'une pompe de la famille RND</b> .....	page 36
Figure 32 : <b>Représentation du mécanisme de changements conformationnels rotatifs</b> .....	page 37
Figure 33 : <b>Arbre de la famille des protéines SMR</b> .....	page 37

Figure 34 : <b>Modèle de la structure des pompes à efflux de la famille SMR</b> .....	page 38
Figure 35 : <b>Représentations de deux mécanismes de transport des pompes à efflux SMR</b> .....	page 39
Figure 36 : <b>Représentation des rôles des pompes à efflux dans la formation de biofilm</b> .....	page 42
Figure 37 : <b>Représentation des différentes échelles d'étude de la virulence</b> .....	page 45
Figure 38 : <b><i>K. pneumoniae</i> in the gastrointestinal (GI) tract in an <i>in vivo</i> murine model</b> .....	page 51
Figure 39 : <b><i>K. pneumoniae</i> in the lungs in an <i>in vivo</i> murine model</b> .....	page 63
Figure 40 : <b>Presence and genomic organization of the Kpg systems in <i>Klebsiella</i> species</b> .....	page 80
Figure 41 : <b>Correlation between the maximum likelihood distances between core genome and KpgC</b> ...	page 81
Figure 42 : <b>Prevalence of Kpg systems outside the <i>Klebsiella</i> genus</b> .....	page 82
Figure 43 : <b>Anti-KpgA Western blot analysis</b> .....	page 83
Figure 44 : <b>Bacterial adhesion on I407 epithelial intestinal cells</b> .....	page 83
Figure 45 : <b>Biofilm formation in the presence or absence of bile salts</b> .....	page 83
Figure 46 : <b>Expression différentielle des gènes de l'opéron <i>mdtJI</i></b> .....	page 104
Figure 47 : <b>Formation de biofilm dans trois modèles expérimentaux</b> .....	page 104
Figure 48 : <b>Comparaison de la solidité du biofilm</b> .....	page 104
Figure 49 : <b>Adhésion bactérienne sur les cellules de la lignée épithéliale pulmonaire Calu-3</b> .....	page 105
Figure 50 : <b>Résistance en macrophages et au stress oxydatif</b> .....	page 105
Figure 51 : <b>Courbes de croissance en présence d'antibiotique</b> .....	page 106
Figure 52 : <b>Représentation des 20 systèmes en plaque « Phenotype Microarrays » de Biolog</b> .....	page 111
<b>Tableau 1:</b> <i>In vivo</i> investigated readouts in classical <i>K. pneumoniae</i> and hypervirulent <i>K. pneumoniae</i> ...	page 50
<b>Tableau 2 :</b> Souches bactériennes et plasmides utilisés au cours de cette étude .....	page 106
<b>Tableau 3 :</b> Amorces utilisées durant cette étude .....	page 107
<b>Tableau 4 :</b> Conditions affectant la croissance du mutant $\Delta mdtJI$ .....	page 111

## Résumé

*Klebsiella pneumoniae* est une entérobactérie à Gram-négatif ubiquiste que l'on retrouve dans l'environnement (sols, eaux de surface, ...) ainsi que dans le système digestif humain. En milieu hospitalier, cette bactérie est un pathogène opportuniste à l'origine d'infections liées aux soins, notamment pulmonaires et urinaires. Grâce à sa capacité à former des biofilms, *K. pneumoniae* colonise facilement les épithéliums tels que ceux des voies aériennes supérieures et du tractus digestif, ainsi que des dispositifs médicaux invasifs. Les phénomènes de colonisation et de formation de biofilm sont des éléments clés de la pathogénicité de *K. pneumoniae*. Ils impliquent des structures de surface, et notamment la capsule polysaccharidique et les fimbriae de type I et de type III (Paczosa et al., 2020). De précédents travaux menés au laboratoire ont permis d'identifier d'autres facteurs de pathogénicité, certains étant spécifiquement impliqués dans la colonisation du tube digestif et des surfaces (Balestrino et al., 2005, 2008; Coudeyras et al., 2008; De Araujo et al., 2010; Hennequin and Forestier, 2007, 2009; Maroncle et al., 2002, 2006). De plus, dans le but d'identifier de nouvelles structures d'adhésion de *K. pneumoniae*, une analyse *in silico* a permis d'identifier une structure de surface de type « chaperone-usher » (CU), appelée Kpg, impliquée dans la colonisation intestinale dans un modèle murin (Khater et al., 2015).

A partir d'un biofilm mature, les bactéries peuvent se disperser sous forme de bactéries isolées ou de petits agrégats. Cette étape de dispersion a longtemps été sous-estimée dans le processus de développement des infections bactériennes, mais des données récentes indiquent qu'elle jouerait un rôle crucial dans l'apparition d'infections aiguës ou chroniques difficiles à éradiquer. Alors que l'impact de la dispersion des biofilms dans la physiopathologie des infections à *K. pneumoniae* est méconnue, nous avons montré que les bactéries dispersées *K. pneumoniae* sont dans un état physiologique spécifique et qu'elles ont des propriétés de colonisation des surfaces accrues comparativement aux formes planctoniques (Guilhen et al., 2019). Une approche globale par séquençage d'ARN (RNAseq) a identifié de nombreux gènes de *K. pneumoniae* surexprimés dans les bactéries dispersées comparativement aux formes sessiles ou planctoniques, et notamment les gènes *mdtIJ* codant la pompe à efflux MdtIJ de la famille des SMR (Guilhen et al., 2016, 2019).

L'objectif de mon projet de thèse était de caractériser les fimbriae Kpg et la pompe à efflux MdtIJ afin de décrire leur rôle dans la pathogénicité de *K. pneumoniae*. Une analyse *in silico* a montré que le système Kpg est retrouvé au sein de plusieurs espèces d'Entérobactéries, principalement au sein d'espèces du genre *Klebsiella*, et que son acquisition résulte probablement de transferts horizontaux de gènes. Bien que le système Kpg soit faiblement exprimé dans la souche *K. pneumoniae* CH1476 en conditions de laboratoire, sa localisation membranaire a été confirmée par Western blot. L'analyse phénotypique d'un mutant déficient  $\Delta kpgABCD$  a montré que le système Kpg est impliqué dans la formation de biofilm en présence de sels biliaires, une condition retrouvée au sein du tractus digestif. En effet, alors que la formation de biofilm de la souche sauvage de *K. pneumoniae* est stimulée par la présence de sels biliaires, aucun effet des sels biliaires n'a été observé pour le mutant isogénique. Aucun rôle du fimbriae Kpg dans l'adhésion aux cellules intestinales n'a cependant été démontré.

La seconde partie de ma thèse a consisté à analyser les propriétés de la pompe à efflux MdtIJ. Pour cela, un mutant isogénique  $\Delta mdtIJ$  a été construit, et ses phénotypes ont été analysés comparativement à ceux de la souche sauvage : capacité à former un biofilm, solidité du biofilm, capacité d'adhésion aux cellules pulmonaires, résistance à la lyse dans les macrophages et croissance en présence de différents substrats. Nous avons ainsi montré que la pompe à efflux a un rôle dans la formation de biofilm sur surface abiotique, dans la survie à l'action lytique des macrophages et dans la résistance à deux antibiotiques de la famille des céphalosporines.

L'ensemble de ce travail a permis de mieux caractériser deux nouveaux facteurs de *K. pneumoniae* potentiellement impliqués dans la pathogénicité : le fimbriae KpgABCD et la pompe à efflux MdtIJ. Bien que les mécanismes moléculaires du fonctionnement de ces déterminants bactériens n'aient pas été démontrés au cours de ce travail, ces derniers pourraient avoir une place dans l'armement déployé par la bactérie pour s'implanter dans un nouvel environnement.



## Abstract

*Klebsiella pneumoniae* is a ubiquitous Gram-negative Enterobacteriaceae found in soils and surface waters as well as in the human tract. In hospitals, *K. pneumoniae* is known as an opportunistic pathogen causing healthcare-related infections, particularly pulmonary and urinary infections. Its ability to form biofilm allow an efficient colonization of invasive medical devices as well as host tissues such as the upper airways and the digestive epitheliums. The biotic and abiotic surface colonization is a major element for the pathogenicity of *K. pneumoniae*. It involves many bacterial surface structures, among them the polysaccharide capsule and type I and type III fimbriae are well described (Paczosa and Meccas, 2016). Previous studies carried out in our laboratory has identified other bacterial factors involved in the pathogenicity of *K. pneumoniae*, including factors involved in the colonization of surfaces and digestive tract (Balestrino et al., 2005, 2008; De Araujo et al., 2010; Hennequin and Forestier, 2007, 2009; Maroncle et al., 2002, 2006). In order to identify new adhesive structures, an *in silico* analysis was performed on *K. pneumoniae* genome and identified a novel chaperone-usher (CU) fimbriae called Kpg. The analysis of the phenotype of a deletion mutant suggested that this fimbriae is involved in intestinal colonization in a murine model (Khater et al., 2015).

From a mature biofilm, bacteria can disperse as isolated bacteria or as small aggregates. This dispersal process has long been underestimated in the development of biofilm secondary bacterial, but recent data indicate that it plays a crucial role in the development of acute or chronic infections. While the impact of biofilm dispersal in the pathophysiology of *K. pneumoniae* infections is poorly understood, we have shown that biofilm-dispersed bacteria are in a specific physiological state with enhanced surface colonization properties compared to planktonic forms (Guilhen et al., 2019). A global RNA sequencing approach (RNAseq) identified many *K. pneumoniae* genes overexpressed in dispersed bacteria compared to sessile or planktonic forms, most notably the *mdtIJ* genes encoding the MdtIJ efflux pump of the SMR family (Guilhen et al., 2016, 2019).

The objective of my thesis project was the characterization of the Kpg fimbriae and the Mdt efflux system in order to decipher their role in the pathogenicity of *K. pneumoniae*. An *in silico* approach revealed that the Kpg system is mainly found in species belonging to the *Klebsiella* genus, and suggested that its acquisition results from horizontal transfers. Although Kpg fimbriae was weakly expressed in the *K. pneumoniae* CH1476 strain under routine laboratory conditions, the presence of this structure on the bacterial membrane was confirmed by Western blot. Given the potential role of this system at the intestinal level, the properties of a *kpgABCD* isogenic mutant to adhere to intestinal cells *in vitro* and to form biofilm in presence of bile salts (which is a physiological condition encountered in the gastrointestinal tract) were evaluated.

Whereas Kpg was not involved to adhere to intestinal cells, a potential role to form biofilm in presence of bile salts was shown. Indeed, while biofilm formation by the wild-type strain is stimulated by bile salts, no effect of bile salts was observed for the isogenic mutant.

The second part of my thesis consisted in analyzing the properties of the MdtIJ efflux pump. For this purpose, an isogenic  $\Delta$ *mdtIJ* mutant was constructed. Since efflux pumps are involved in many bacterial processes, phenotypes of an isogenic  $\Delta$ *mdtIJ* mutant were analyzed and compared to those of the wild-type strain: ability to form a biofilm, biofilm strength, ability to adhere to lung cells, resistance to lysis in macrophages and growth in the presence of different substrates. We have shown that the efflux pump has a role in the formation of biofilm on abiotic surfaces, in the survival of the lytic action of macrophages and in the resistance to two antibiotics of the cephalosporin family.

This work allowed a better characterization of two new factors of *K. pneumoniae* potentially involved in pathogenicity: the fimbriae KpgABCD and the efflux pump MdtIJ. Although the underlying molecular mechanisms of the functions of these determinants were not identified in this work, they may have a place in the armament deployed by the bacteria to establish in a new environment.

---

# Introduction bibliographique

---

Classification by:		
Cowan	Bascomb	Ørskov
<i>K. aerogenes</i>	<i>K. aerogenes/oxytoca/</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>K. edwardsii</i>	<i>edwardsii</i>	<i>subsp. pneumoniae</i>
<i>subsp. edwardsii</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>subsp. ozaenae</i>
<i>subsp. atlantae</i>	sensu stricto	<i>subsp. rhinoscleromatis</i>
<i>K. pneumoniae</i>	sensu lato	<i>K. oxytoca</i>
<i>K. ozaenae</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>K. terrigena</i>
<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. planticola</i> (syn.
	<i>K. "unnamed group"</i>	<i>K. trevisanii</i> )
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>K. ornithinolytica</i>

Figure 1 : **Classifications des espèces du genre *Klebsiella***. Trois différentes classifications ont été mises en place par Cowan, Bascomb et Ørskov en utilisant différents systèmes taxonomiques (Podschn and Ullman, 1998).

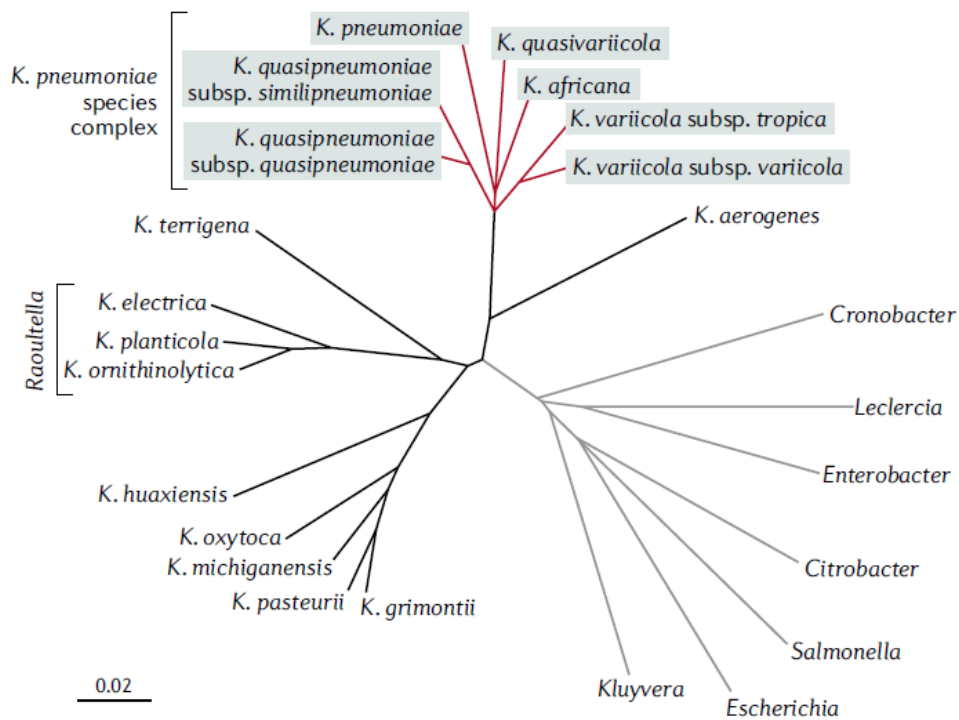


Figure 2 : **Représentation de la position taxonomique de *Klebsiella pneumoniae***. L'arbre phylogénétique basé sur les génomes complets représente les relations phylogénétiques entre le complexe d'espèces *K. pneumoniae* (en rouge), les espèces du genre *Klebsiella* (en noir) et des familles d'*Enterobacteriaceae* (en gris). L'échelle correspond à une moyenne de divergence nucléotidique estimée (Wyres et al., 2020).

## 1. Généralités sur *Klebsiella pneumoniae*

### 1.1. Taxonomie et phylogénie du genre *Klebsiella*

*Klebsiella pneumoniae* a été pour la première fois reconnue comme une bactérie responsable d'infections respiratoires par le microbiologiste Carl Friedländer en 1882, après avoir été très fréquemment observée au niveau des voies respiratoires d'individus atteints de pneumonies (Brisse et al., 2006; Sale and Wood, 1947). Après avoir été nommé quelques années le bacille de Friedländer, le genre *Klebsiella* a finalement été désigné en l'honneur du microbiologiste allemand Edwin Klebs et de ses nombreux travaux de recherche sur les maladies infectieuses (Brisse et al., 2006). Le genre *Klebsiella* est défini comme comprenant des bactéries à Gram-négatif de la famille des entérobactéries, non mobiles, possédant généralement une capsule, produisant de la lysine décarboxylase et positives au test Voges-Proskauer (Edwards and Ewing, 1986). L'importance du genre *Klebsiella* au niveau clinique en a rapidement fait le sujet de nombre d'études et a conduit à la mise en place précoce d'une classification. Ainsi ce genre a d'abord été subdivisé en 3 sous-espèces basées sur l'origine des souches et les pathologies cliniques associées : *K. pneumoniae*, *K. ozaenae*, et *K. rhinoscleromatis* (Podschun and Ullmann, 1998). Ces 3 anciens groupes taxonomiques, ne pouvant pas être séparés de l'espèce *K. pneumoniae* d'un point de vue génomique, sont désormais décrits comme 3 clones appartenant à cette espèce (Brisse et al., 2009). Au fil des années, la découverte de nouvelles espèces bactériennes a permis à la classification du genre *Klebsiella* de s'étoffer. De nombreuses espèces ont été ajoutées, déplacées voire même retirées en fonction des études, permettant à cette classification d'évoluer vers une phylogénie plus réaliste. La taxonomie des espèces de ce genre a souvent été basée sur les activités enzymatiques et les substrats utilisés par les différentes souches, ainsi que sur leur sérotype capsulaire. Mais cette taxonomie a été modifiée au fur et à mesure de l'apparition de nouvelles méthodes expérimentales et numériques. Depuis les années 1960, différentes classifications du genre *Klebsiella* ont ainsi été proposées dont les trois principales sont celles de Cowan, Bascomb et Ørskov (Figure 1) (Podschun and Ullmann, 1998). L'augmentation du nombre d'isolats cliniques identifiés ainsi que les nouvelles méthodes de séquençage (whole-genome sequencing) ont fourni une base de données importante permettant d'établir une nouvelle taxonomie du genre *Klebsiella* basée sur des approches évolutives de comparaison des séquences nucléiques (Wyres et al., 2020) (Figure 2). Ces approches moléculaires ont permis de corriger l'identification erronée de certains isolats cliniques, notamment des souches faussement identifiées comme *K. pneumoniae* mais appartenant en réalité à des espèces étroitement liées. Au sein du genre *Klebsiella*, *K. pneumoniae* est l'espèce dominante en clinique humaine et une grande part des travaux de recherche disponibles se concentrent sur son étude (Brisse and Verhoef, 2001). Son groupe phylogénétique est longtemps resté non défini, mais il a récemment

été désigné comme le « *K. pneumoniae* species complex » (KpSC) (Brisse and Verhoef, 2001; Wyres et al., 2020).

## 1.2. Écologie

Les bactéries du genre *Klebsiella* sont ubiquistes. L'espèce *K. pneumoniae* peut survivre dans de multiples niches écologiques, que ce soit dans un mode de vie libre ou associée à une surface ou un organisme hôte (Podschun and Ullmann, 1998). Parmi les niches environnementales de *K. pneumoniae*, on retrouve le sol, les plantes, les eaux de surface ainsi que certaines ressources alimentaires (Bagley, 1985a; Podschun et al., 2001). Les souches de *K. pneumoniae* issues de l'environnement sont souvent moins bien caractérisées que les isolats cliniques, alors qu'elles constituent de potentielles sources de contamination (Runcharoen et al., 2017). Certaines études ont montré des similarités entre des souches de *K. pneumoniae* d'origine environnementale et clinique (Matsen et al., 1974; Seidler et al., 1975), alors que d'autres ont mis en avant des différences de virulence entre des isolats de ces deux origines (Davis and Price, 2016; Knittel et al., 1977). Cependant la sélection et la diffusion de souches virulentes restent des phénomènes majoritairement observés dans les populations de *K. pneumoniae* retrouvées au niveau hospitalier (Runcharoen et al., 2017). *K. pneumoniae* est aussi connue pour coloniser les surfaces muqueuses des animaux et des humains au niveau des voies nasopharyngées et du système digestif. Les interactions entre *K. pneumoniae* et son hôte sont complexes, et la bactérie peut aussi bien jouer le rôle d'un commensal que d'un pathogène opportuniste. Le taux de portage intestinal de *K. pneumoniae* au niveau communautaire est difficile à évaluer mais il a été estimé aux alentours de 4 à 6% dans des études menées en Australie et aux Etats-Unis (Conlan et al., 2012; Gorrie et al., 2017). Les estimations diffèrent d'une étude à l'autre mais la localisation géographique semble avoir une influence sur le portage intestinal qui est plus élevé dans certains pays d'Asie (Chung et al., 2012; Lin et al., 2012). De plus, le taux de portage se révèle beaucoup plus élevé (variable entre les études de 19 à 77%) chez les patients ayant été hospitalisés, et il tend à augmenter avec la durée de l'hospitalisation (Gorrie et al., 2017; Ludden et al., 2020; Martin et al., 2016; Podschun and Ullmann, 1998; Selden, 1971). Ce taux plus élevé résulte de la pression de sélection au niveau hospitalier due à l'utilisation d'antibiothérapies favorisant la prolifération des souches résistantes (Selden, 1971). La prévalence de cette espèce en milieu hospitalier est l'une des raisons pour lesquelles cette bactérie est aujourd'hui reconnue comme l'un des principaux pathogènes opportuniste à l'origine d'infections liées aux soins.

### 1.3. Épidémiologie et infections hospitalières

La majorité des infections causées par *K. pneumoniae* sont des infections liées aux soins, bien que le pathogène soit également responsable d'infections communautaires. En 2021, les infections liées aux soins constituent toujours un problème de santé majeure. Un rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé estime que plus de 1,4 million de personnes souffrent d'une telle infection dans le monde (Girard et al.). En France, selon l'Enquête Nationale de Prévalence de 2017, environ 5% des personnes hospitalisées contractent une infection nosocomiale durant leur séjour à l'hôpital (Santé Publique France, 2019). On estime ainsi qu'entre 7 000 à 10 000 patients décèdent chaque année des conséquences de ces infections. À ce coût humain s'ajoute un surcoût financier important lié à l'augmentation du séjour et de la durée des soins des patients.

En France, *K. pneumoniae* se place en 5<sup>ème</sup> position des agents responsables d'infections liées aux soins avec un taux d'incidence de plus en plus important (Santé Publique France, 2019). Elle est responsable notamment de pneumonies, d'infections du tractus urinaires (UTIs) et de bactériémies (Martin and Bachman, 2018). *K. pneumoniae* a été identifiée comme respectivement responsable de 8% et 12% des cas des pneumonies nosocomiales en France et aux Etats-Unis (Magill et al., 2014; Santé Publique France, 2019). Le taux de mortalité de pneumonies dues à *K. pneumoniae* est estimé à environ 50%. Les différentes espèces de *Klebsiella* sont d'ailleurs une cause majeure des pneumonies acquises sous ventilation mécanique chez les patients en unité de soin intensif (Kalanuria et al., 2014). Le tractus urinaire est également un des sites d'infection le plus fréquent de *K. pneumoniae*; 15% des cas d'infection urinaire en secteur hospitalier aux Etats-Unis sont dues à *K. pneumoniae*, l'agent principal étant *Escherichia coli*. Ces infections sont largement associées à la présence de cathéters urinaires chez les patients, favorisant l'adhésion des bactéries et la formation de biofilm (Schroll et al., 2010). Enfin, *K. pneumoniae* est aussi impliquée dans des bactériémies, résultant fréquemment de la dissémination des bactéries à partir d'un autre site infectieux (Martin and Bachman, 2018). La transmission de *K. pneumoniae* en milieu hospitalier est rapide et efficace, ce qui a conduit à de nombreuses épidémies dans des unités de soins intensifs adultes ou néonataux (Asensio et al., 2000; Giuffrè et al., 2013; Gupta, 2002; Mammina et al., 2010; Podschun and Ullmann, 1998). Elle est liée à des contacts entre le personnel de santé et les patients, la présence manuportée du pathogène étant une source importante de contamination (Casewell and Phillips, 1977). La contamination d'instruments médicaux et des surfaces de travail a aussi été identifiée comme une source de transmission (Jarvis et al., 1985). Le portage intestinal du pathogène, qu'il précède l'hospitalisation ou qu'il ait été acquis subséquent, constitue également une importante source de contamination. Bien qu'asymptomatique chez les individus en bonne santé, la colonisation intestinale par *K. pneumoniae* se révèle à risques chez certains groupes présentant des facteurs de fragilité, tels les nouveau-nés, les personnes âgées ou

immunodéprimées (Wyres et al., 2020). Une corrélation a ainsi été établie entre un portage intestinal de *K. pneumoniae* préalablement à la survenue d'une infection (Fung et al., 2012; Gorrie et al., 2017; Selden, 1971). De plus, de nouvelles approches moléculaires ont permis de confirmer que des isolats de *K. pneumoniae* responsables d'infections, notamment pulmonaires et urinaires, présentent des homologues très importantes avec les souches isolées du microbiote intestinal de ces mêmes patients (Gorrie et al., 2017; Martin et al., 2016). Le tube digestif des patients est donc un réservoir favorable à la prolifération de *K. pneumoniae*. Le processus physiopathologique permettant d'expliquer la survenue d'infections à partir de ce réservoir initial est méconnu ; la voie de contamination endogène, c'est-à-dire le franchissement de la barrière épithéliale intestinale, est considérée comme une possible voie d'infection mais n'a pour l'instant pas pu être clairement mise en évidence (Joseph et al., 2021).

#### 1.4. Caractéristiques des souches de *Klebsiella pneumoniae*

Toutes les souches de *K. pneumoniae*, indépendamment de leur origine, ne sont pas capables de survivre chez l'hôte et de conduire à une infection. En effet, leurs capacités physiopathologiques ne résultent pas seulement de la susceptibilité de l'hôte mais sont dépendantes des différents traits génétiques des souches. Au sein de l'espèce *K. pneumoniae*, tous les membres partagent un ensemble de gènes définissant le core génome de l'espèce. Celui-ci est présent dans plus de 95% des isolats et est actuellement estimé à environ 2 000 gènes (Holt et al., 2015). Or, le génome de *K. pneumoniae* comprenant entre 5 000 et 6 000 gènes, la majorité de ce génome est donc constitué d'éléments variables ; il existe donc une grande variabilité intra-espèce. Ce pool de gènes variables, défini comme le génome accessoire pourrait être à l'origine de la diversité de phénotype observée parmi les isolats cliniques, expliquant l'efficacité de certaines souches à générer des infections. Une partie de ce génome accessoire est composée de gènes et d'ilots génétiques acquis par la bactérie via des transferts horizontaux, ainsi que d'éléments génétiques portés par des plasmides conjugatifs. Ces éléments mobiles permettent un « saut dans le temps » au niveau évolutif avec une acquisition rapide de propriétés telles que des résistances antimicrobiennes, des traits de virulence ou des voies métaboliques permettant de s'adapter à un nouvel environnement. Le génome accessoire fournit ainsi de nombreuses fonctions susceptibles d'aider la bactérie dans des processus spécifiques, et notamment pour la survie et la colonisation des sites infectieux (Martin and Bachman, 2018). Cependant, une part importante des fonctions codées par le génome accessoire reste méconnue (Holt et al., 2015). Il est important de souligner que les déterminants de la pathogénicité de *K. pneumoniae* sont présents à la fois sur le génome accessoire mais également dans le core génome de la bactérie (Martin and Bachman, 2018).

En raison de leur importante hétérogénéité génomique, les souches de *K. pneumoniae* ont été regroupées selon un autre critère, leur pouvoir pathogène. Cela a permis de définir deux groupes ou « pathotypes » : les souches dites « classiques » (cKp) et les souches hypervirulentes (hvKp). Les cKp sont habituellement retrouvées au niveau du tube digestif de l'hôte de façon asymptomatique et transitoire. Elles appartiennent au pathobionte de l'hôte et ne conduisent à une infection que dans certaines circonstances, telles qu'une altération de la composition du microbiote intestinal ou une diminution des défenses immunitaires de l'hôte (Chow and Mazmanian, 2010). Pour ces raisons, les cKp peuvent être qualifiées de souches opportunistes. L'administration d'antibiotique peut également favoriser le développement d'infections dues à des souches cKp, car, outre le fait d'entraîner une dysbiose intestinale, une antibiothérapie permet de favoriser la sélection et la prolifération des clones de cKp résistants aux antibiotiques (Rose and Schreier, 1968). L'émergence et la diffusion de souches cKp résistantes aux antibiotiques sont des préoccupations majeures ces dernières années en raison des difficultés de traitement générées. Les souches de *K. pneumoniae* multirésistantes sont isolées partout dans le monde et l'agent dominant dans les pays occidentaux est principalement cKp (multirésistante ou non), où elle est essentiellement la cause d'infections acquises en milieu hospitalier (Russo and Marr, 2019). En comparaison, les infections causées par les souches hvKp sont majoritairement des infections communautaires chez des patients sans facteur de comorbidité (Fung et al., 2012; Shon et al., 2013). Plusieurs études ont identifié des souches hvKp dans les selles de patients et ainsi mis en lumière une forte association entre portage intestinal et survenue d'infections sévères à hvKp (abcès non hépatiques, pneumonies, endophtalmies et méningites) (Choby et al., 2020; Chung et al., 2012; Fung et al., 2012; Gorrie et al., 2017). Ces infections sont remarquables par leur sévérité avec de multiples sites infectieux ou une propagation métastatique du pathogène (Russo and Marr, 2019). La virulence accrue des souches hvKp résulte de l'expression de multiples facteurs de virulence, notamment la production importante de polysaccharides capsulaires associés au sérotype K1 ou K2 qui confèrent un phénotype hypermuqueux aux colonies bactériennes. La détermination de ce phénotype a parfois été utilisé pour qualifier une souche d'hypervirulente, ce qui a créé une confusion dans la littérature entre les deux groupes, cKp et hvKp, car ce caractère n'est pas suffisamment discriminant (Catalán-Nájera et al., 2017; Russo et al., 2018). Les souches hvKp sont également plus susceptibles de produire différents types de sidérophores, des molécules sécrétées par la bactérie pour capter des ions ferriques dans le milieu environnant. Cependant, les gènes chromosomiques codant des sidérophores sont également présents dans le génome de certaines souches cKp ; ce caractère n'est donc pas suffisant pour définir un isolat comme hypervirulent. Une caractéristique désormais considérée comme déterminante pour définir le statut d'hvKp est la présence d'au moins un plasmide (pK2044 ou pLVPK, par exemple) ou élément génétique mobile



porteurs de gènes de virulence (Russo et al., 2018). Historiquement, les premières infections à hvKp ont été décrites dans des pays d'Asie (Lederman and Crum, 2005), mais leur incidence n'a cessé d'augmenter au cours des dernières années, et elles concernent actuellement les autres régions du monde (Cubero et al., 2016; Fazili et al., 2016; Rossi et al., 2018). Les clones hypervirulents initialement détectés montraient des taux de résistance aux antibiotiques très faibles, avec moins de 5% des isolats possédant des gènes codant des  $\beta$ -lactamase à spectre étendus, et moins de 2% des isolats résistants à un autre type d'antibiotique que l'ampicilline pour laquelle la résistance est intrinsèque à l'espèce *K. pneumoniae* (Fang et al., 2007; Ko, 2002). Cependant, au fil du temps est apparue une convergence entre gènes de résistances aux antibiotiques et gènes codant des facteurs de virulence, ce qui a conduit à l'apparition de bactéries dites « superbugs » présentant les deux traits et qui sont aujourd'hui l'une des grandes préoccupations au niveau mondial (Lee et al., 2017).

## 2. La colonisation des surfaces par *K. pneumoniae*

### 2.1. L'adhésion bactérienne

Les bactéries sont capables d'adhérer à pratiquement toutes les surfaces synthétiques ou naturelles (Hall-Stoodley et al., 2004) et ce phénomène d'attachement a souvent un effet significatif sur leur écologie, leur physiologie et leur comportement. La compréhension des mécanismes qui régissent l'attachement des bactéries à la surface est un axe de recherche très développé dans la littérature depuis les années 1970, aussi bien au travers de la microbiologie environnementale que clinique. Il existe une diversité de mécanismes d'attachement qui résulte inévitablement de la diversité des microorganismes impliqués dans ces processus et, de la même manière, de la variété de types de surfaces pouvant être colonisées. Ces mécanismes sont fréquemment séparés entre des types d'interactions non spécifiques et spécifiques. Les mécanismes non spécifiques sont ceux pour lesquels les bactéries s'attachent à un substrat sans préférence pour ce dernier et peuvent logiquement être mis en place par tous les types de microorganismes. L'adhésion non spécifique s'apparente en grande partie à la colonisation des surfaces non biologiques comme notamment les environnements aquatiques et le sol mais peut également être observée chez l'hôte lors de la colonisation de corps étranger (implants, prothèses). Ce processus, souvent fortuit, résulte d'interactions physicochimiques conduisant à l'adsorption des bactéries sur la surface (Fletcher, 1996). Les mécanismes spécifiques sont ceux qui mettent en jeu une complémentarité stéréochimique entre un composé bactérien et un récepteur présente sur le substrat. L'adhésion spécifique est un processus évolutif qui a permis aux bactéries de coloniser la surface des plantes et des animaux, ainsi que d'autres microorganismes via un nombre diversifié de molécules spécifiques appelées « adhésine ». La recherche s'est orientée fortement vers les aspects cliniques de l'adhésion aux surfaces puisqu'il s'agit d'une des premières

étapes essentielles d'un processus infectieux plus complexe offrant à un agent infectieux la possibilité de former du biofilm puis de se disperser chez l'hôte. Il a ainsi pu être mis en évidence que de nombreuses adhésines bactériennes permettent la colonisation des surfaces mucoales humaines au niveau du tractus digestif, respiratoire et urinaire en fonction du tropisme du microorganisme envahisseur (Falkow et *al.*, 2006; Fletcher, 1996).

Pour déclencher les mécanismes d'adhésion, les bactéries sont capables de détecter les changements spatiaux de concentration de certains composés ou les variations de l'environnement à proximité de leur surface. Les conditions environnementales comme la température, l'osmolarité, le pH ou les forces de cisaillement influencent donc largement ces mécanismes (Berne et *al.*, 2015). Les bactéries sont par exemple capables d'induire un processus d'adhésion après reconnaissance de changements d'osmolarité ou de pH du milieu. Pour les bactéries à Gram-négatif, les variations d'osmolarité sont ressenties via leur système membranaire OmpA, ce qui conduit à la transcription de multiples gènes. Par exemple, chez *E. coli*, OmpA active l'expression de la voie Cpx impliquée dans la régulation de l'expression de pili (Hung et *al.*, 2001; Ma and Wood, 2009).

Le phénomène d'adhésion aux surfaces confère de nombreux avantages aux bactéries, mais il peut être simplement résumé comme un mécanisme de survie privilégié des microorganismes. Au niveau des surfaces biotiques, l'étape précédant l'adhésion des microorganismes est la formation d'une surface ou d'un film de conditionnement résultant de l'interaction entre le substrat et son environnement (Boland et *al.*, 2000; Gristina, 1987). Une surface plongée dans un fluide va recevoir des éléments par sédimentation mais sera également le siège d'une adsorption spontanée des composés de ce milieu (molécules organiques, sels, protéines et ions). Ce film modifie ainsi les propriétés physico-chimiques de la surface externe ce qui influence le comportement des bactéries (Barre and Haras, 2007). Il a par exemple été montré par Herrmann et *al.* que des Staphylocoques à coagulase négative avait une capacité d'adhésion augmentée sur un substrat en polyméthacrylate de méthyle lorsque ce dernier était recouvert de protéines issues de plasma, telle que de la fibronectine (Herrmann et *al.*, 1988). De plus, ce phénomène d'adsorption favorise la présence de nutriment et de matière organique à la surface du substrat. Dans le cas où la concentration en nutriment dans le milieu est plus faible qu'au niveau d'une surface, il est intéressant pour une bactérie de passer à un « mode de vie fixée » où sa croissance sera stimulée (Zobell, 1943). Ainsi, il a pu être montré qu'en conditions défavorables, les bactéries adhérentes sont capables de survivre alors même que la concentration en nutriment du milieu est trop faible pour assurer leur croissance (Heukelekian and Heller, 1940). Également, une bactérie adhérente à une surface, indépendamment de la formation d'un biofilm, a une tolérance aux stress extérieurs plus élevée que celle d'une bactérie libre dans le milieu. Ce phénotype semble résulter de l'augmentation de la stabilité membranaire des microorganismes lorsqu'ils sont

fixés à une surface (Hall-Stoodley et al., 2004; John et al., 2011). Les surfaces peuvent également fournir des métabolites et des cofacteurs aux microorganismes. Certains genres bactériens se développent ainsi sur des surfaces métalliques et utilisent des ions disponibles pour leurs activités métaboliques. C'est le cas de *Shewanella* qui utilise le fer et le magnésium des supports comme accepteurs finaux d'électrons dans le processus de respiration (Nealson and Finkel, 2011).

La détection des surfaces par les bactéries résulte en une variété de changements cellulaires. Beaucoup de ces modifications sont morphologiques et permettent à la bactérie d'adhérer. Ainsi, lors d'un contact avec une surface, *Pseudomonas aeruginosa* active le système Wsp qui constitue un complexe protéique homologue à un système de chimiotactisme bactérien. La protéine WspA du système détecte la surface et transmet un signal aux autres protéines du complexe, ce qui conduit à la phosphorylation de la protéine WspR. WspR a pour action de catalyser la synthèse de di-GMP cyclique (c-di-GMP) qui, en plus de jouer un rôle dans la formation de biofilm, est impliqué dans la régulation de nombreux systèmes jouant un rôle dans la mobilité et l'attachement des bactéries. Chez *P. aeruginosa*, l'augmentation intracellulaire de c-di-GMP conduit à l'inhibition de la production de flagelle et à l'activation de l'expression de gènes nécessaires à la synthèse des substances extracellulaires polymériques (EPS) nécessaires à la formation d'un biofilm (Güvener and Harwood, 2007; Hengge, 2009; Tuson and Weibel, 2013; Valentini and Filloux, 2016). Ainsi, l'adhésion bactérienne est une première étape essentielle à la formation d'un biofilm. Parmi les avantages apportés par l'adhésion, la possibilité de coloniser une surface et d'initier la formation d'un biofilm est un atout dans la survie bactérienne.

## 2.2. Définition d'un biofilm

Dans la plupart des environnements, les biofilms constituent le mode de vie prédominant des microorganismes. En effet, on estime que 80% de la biomasse microbienne terrestre est sous forme de biofilms (Richards and Melander, 2009). Ce mode de vie, dit sessile, se définit comme des communautés de microorganismes intégrés dans une matrice extracellulaire autoproduite, et adhérant à une surface biotique ou abiotique. En milieu naturel, les biofilms sont souvent complexes car formés par de nombreuses espèces procaryotes et eucaryotes (bactéries, archées, protistes, champignons, algues unicellulaires, ...), et des virus (Costerton et al., 1995). Ce mode de vie apparaît comme une réponse adaptative face à un environnement hostile ne permettant pas la croissance ou la survie sous forme planctonique.

Les biofilms sont ubiquistes et retrouvés dans diverses niches écologiques associés à des surfaces végétales, minérales ou animales. Ils jouent un rôle écologique essentiel en contribuant au bon fonctionnement des écosystèmes, mais interfèrent également avec de nombreuses activités humaines

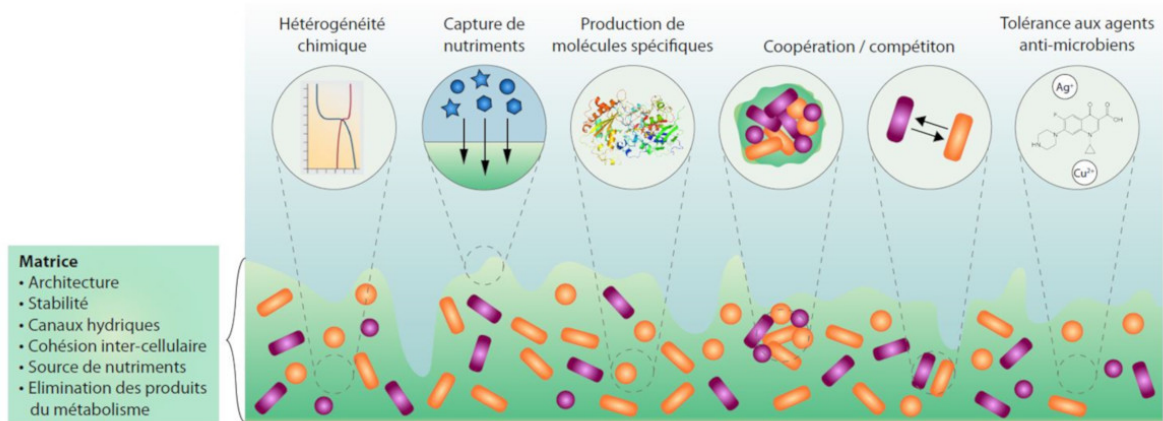


Figure 3 : **Propriétés spécifiques d'un biofilm bactérien.** Le biofilm est une structure hétérogène présentant des variations locales de composition en nutriments, enzymes, et autres molécules produites par les bactéries, créant ainsi de multiples microenvironnements. Ce mode de vie englobée dans une matrice extracellulaire confère une protection aux bactéries vis-à-vis des agressions extérieures (agents anti-microbiens, immunité de l'hôte) et une disponibilité en nutriments et autres molécules spécifiques (Source : <https://www.encyclopedie-environnement.org/>).

dans les secteurs de l'agroalimentaire, de l'industrie et de la santé humaine et animale où ils constituent une source de nuisances importantes en colonisant par exemple des denrées alimentaires ou des dispositifs médicaux invasifs (cathéters, sondes, prothèses...) (Hall-Stoodley et al., 2004). En médecine humaine, la lutte contre les biofilms est un enjeu majeur puisqu'ils constituent un réservoir potentiel de pathogènes, favorisant le développement d'infections chroniques ou liées aux soins (Miquel et al., 2016).

### 2.3. Avantages du mode de vie sessile

Contrairement à la forme planctonique, la forme sessile confère de nombreux avantages aux bactéries. De multiples mécanismes, ainsi que l'organisation structurale du biofilm et la présence de matrice extracellulaire, jouent un rôle important dans la protection des communautés vis-à-vis des agressions extérieures (Figure 3).

Au sein d'un biofilm, les bactéries sont maintenues et protégées par la matrice qui les entoure. En effet, les substances polymériques extracellulaires formant la matrice sont capables (i) de limiter l'accès à certains agents antimicrobiens, comme les aminoglycosides, en agissant comme échangeurs d'ions (Gilbert et al., 1997; Nichols et al., 1988, 1989; Nickel et al., 1985), (ii) de séquestrer des éléments hostiles, métaux, cations et toxines (Barnes, 1990; Flemming, 1993), et (iii) de fournir une protection contre divers stress environnementaux comme les radiations UV ou des variations de pH et d'osmolarité (Flemming, 1993). La présence physique de la matrice permet également de fournir une protection efficace vis-à-vis des éléments de l'immunité de l'hôte (Bengoechea and Sa Pessoa, 2019), notamment car les composants de la matrice sont peu immunogènes (Joo and Otto, 2012). D'autre part, les cellules de l'immunité telles que les leucocytes ne sont pas capables de pénétrer l'intérieur du biofilm et les anticorps produits perdent en efficacité en pénétrant le biofilm (Davies, 2003; Fux et al., 2005).

D'un point de vue métabolique, le mode de vie en biofilm permet de fournir un accès privilégié aux nutriments pour les bactéries. La matrice maintient un environnement hydraté et facilite la captation de nutriments à partir de l'environnement extérieur. Elle est également constituée de diverses molécules qui, lorsqu'elles sont dégradées, peuvent fournir des ressources nutritives. C'est le cas des composés exopolysaccharidiques qui génèrent des sources de carbone, d'azote et de phosphore (Davey and O'toole, 2000). De plus, les biofilms hébergent une variété d'espèces microbiennes aux caractéristiques métaboliques distinctes qui sont capables de coopérer d'un point de vue métabolique. Par exemple, les bactéries fermentaires produisent à partir de matières organiques des acides et alcools, qui peuvent être ensuite utilisés par les bactéries acétogènes. Le biofilm représente ainsi un

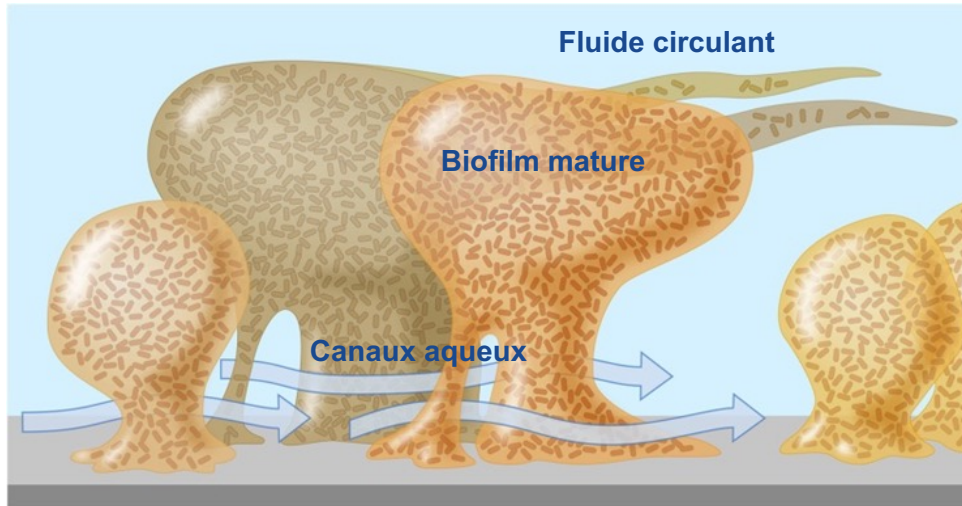


Figure 4 : **Représentation schématique de l'architecture d'un biofilm mature.** Un biofilm présente une structure tridimensionnelle formée des piliers traversés par des canaux aqueux permettant la circulation des fluides, contribuant à la diffusion des nutriments et à l'évacuation des déchets (Adapté de Kovaleva et *al.*, 2013).

environnement adéquat pour la mise en place de relations syntrophiques entre microorganismes (Davey and O'toole, 2000).

Les transferts horizontaux de gènes sont des mécanismes importants pour l'évolution et la diversité génétique des communautés microbiennes. Dans un biofilm, la proximité cellulaire est une circonstance idéale pour favoriser le transfert d'éléments génétiques entre bactéries, notamment via des phénomènes de conjugaison (Davey and O'toole, 2000). Divers travaux ont ainsi pu mettre en lumière que le transfert et la propagation d'éléments génétiques comme les plasmides ou les transposons peuvent avoir lieu au sein de biofilms mono- et pluri-espèces (Christensen et al., 1998; Lebaron et al., 1997; Roberts et al., 1999).

#### 2.4. Structure et composition du biofilm

Les biofilms sont des structures tridimensionnelles organisées et hétérogènes, dans lesquelles les agrégats bactériens sont séparés les uns des autres par des espaces libres correspondant à des canaux hydriques. Ces canaux permettent la circulation de fluides au sein du biofilm, et donc la diffusion des nutriments et de l'oxygène ainsi que l'évacuation des déchets (Donlan and Costerton, 2002; Stewart and William Costerton, 2001) (Figure 4). Un biofilm est un environnement hétérogène, aussi bien en termes d'osmolarité, de pH, de répartition des nutriments ou de l'oxygène, ce qui entraîne une répartition hétérogène des communautés microbiennes.

La matrice exopolysaccharidique constitue la majeure partie du biofilm avec près de 90% de la masse sèche de la plupart des biofilms (Flemming and Wingender, 2010). Elle est essentiellement composée d'eau et d'un mélange complexe de polymères comprenant des polysaccharides, des protéines, de l'ARN et de l'ADN, mais sa composition est très variable en fonction des espèces présentes et des conditions environnementales. Des éléments provenant du milieu environnant du biofilm comme des nutriments, des ions, des métabolites et des produits de la lyse cellulaire peuvent également être retrouvés dans la matrice (Costerton et al., 1994; Jamal et al., 2018). Enfin, bien que peu décrit dans la littérature, d'autres molécules tels que des surfactants, des lipides, des glycolipides ou encore des vésicules membranaires contenant des enzymes peuvent être retrouvés dans la matrice du biofilm (Karatan and Watnick, 2009).

Certains biofilms pauvres en nutriments, dits oligotrophes, permettent la mise en place d'une stratification des communautés. Ainsi les microorganismes présents dans les couches supérieures du biofilm bénéficient de toutes les sources nutritives, privant les bactéries présentes dans les couches inférieures de ces apports. Ces dernières, du fait d'une activité métabolique réduite, se mettent en état de « dormance » et ne se multiplient pas ou lentement ; elles sont qualifiées de *persisters*. Les *persisters* sont capables de survivre en présence de fortes concentrations de molécules

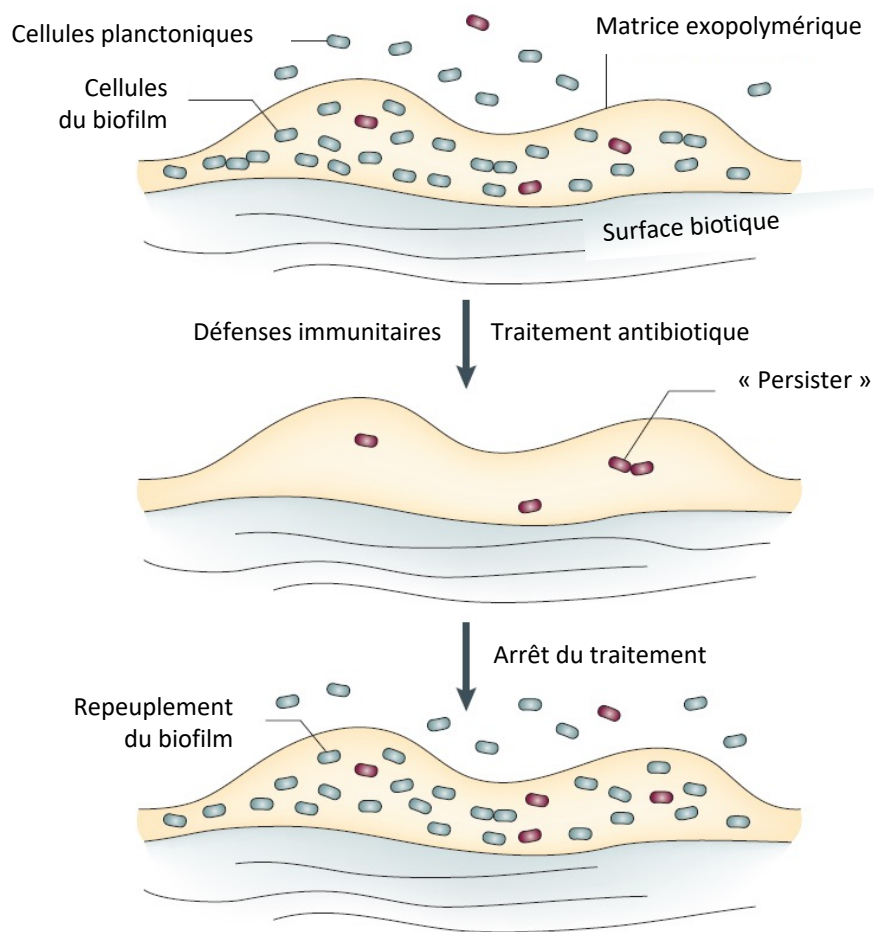


Figure 5 : **Représentation schématique du rôle des « persisters » dans la résilience des biofilms.** Au sein d'un biofilm, les bactéries métaboliquement actives sont éliminées par un traitement antibiotique, alors que les « persisters » ne sont pas affectés. Après l'arrêt du traitement, les « persisters » retrouvent une activité métabolique et se multiplient, ce qui permet le repeuplement du biofilm (Adapté de Lewis, 2007).



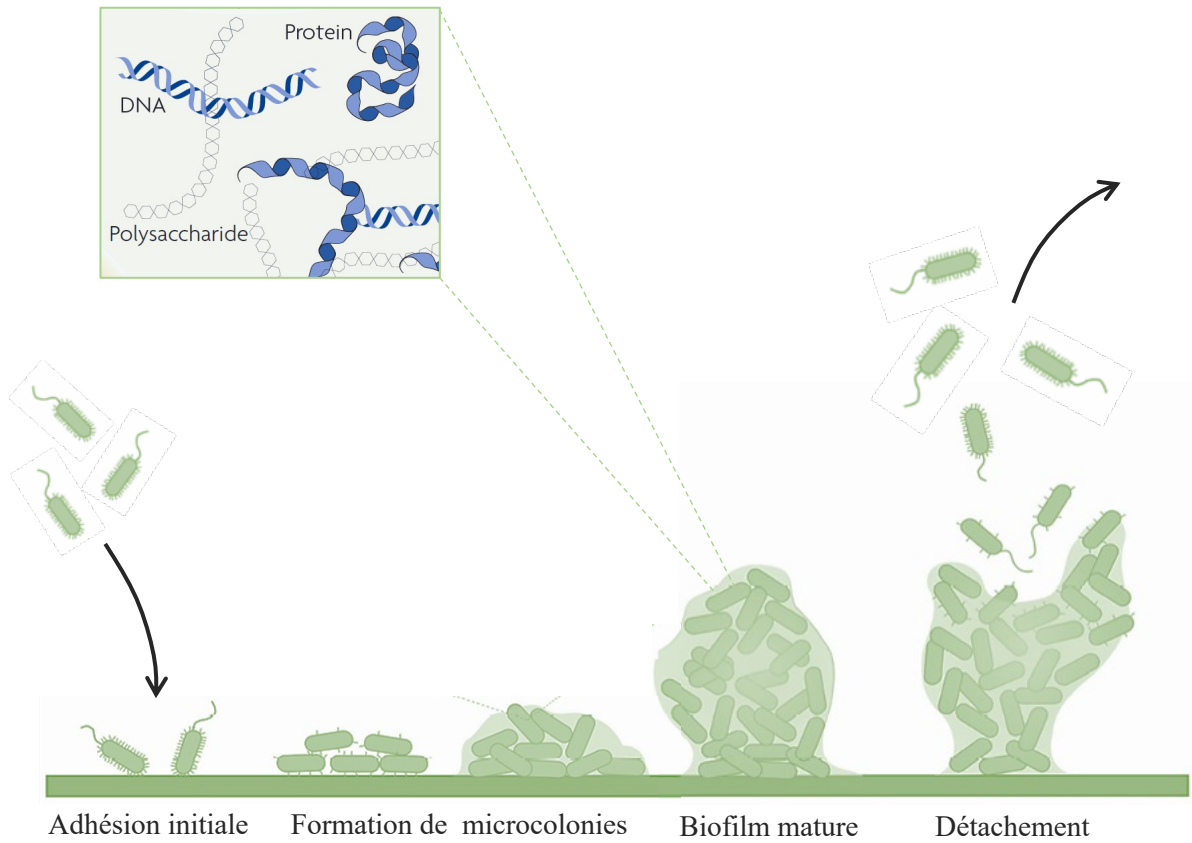


Figure 6 : **Représentation schématique des différentes étapes du développement d'un biofilm.** Après l'adhésion des bactéries à la surface, elles se multiplient pour former des microcolonies. Le processus de maturation, qui s'accompagne d'une synthèse importante de substances polymériques extracellulaires (exopolysaccharides, protéines et ADN), conduit à la formation d'un biofilm structuré. Des bactéries peuvent alors se détacher du biofilm par le biais de processus passifs et actifs pour aller coloniser de nouvelles surfaces (Adapté de de Flemming and Wingender, 2010 ; Maunders and Welch, 2017).

antimicrobiennes, notamment les antibiotiques. Ce phénotype est réversible : un *persister* ayant survécu à un stress est capable de se multiplier à nouveau une fois le stress évacué. La persistance bactérienne est ainsi un facteur important de la survie et de la résilience des populations bactériennes lors de traitements anti-infectieux (Flemming, 2016; Prax and Bertram, 2014) (Figure 5).

## 2.5. Les étapes de développement du biofilm

Le passage des bactéries de l'état planctonique vers la forme sessile conduit à un remaniement phénotypique et une profonde modification du profil d'expression génique (Guilhen et al., 2016). Les mécanismes conduisant à la formation du biofilm sont variables entre les espèces bactériennes. Cependant, le développement d'un biofilm est un processus qui se décline dans la majorité des cas en trois étapes principales, allant de l'adhésion des bactéries à une surface, à la formation d'agrégats englobés dans une matrice, jusqu'à l'étape ultime de dispersion sous forme de bactéries isolées ou de petits agrégats. Cette dernière étape se produit naturellement à partir d'un biofilm mature, mais peut également être déclenchée par des événements extérieurs tels que des stress environnementaux jusqu'au détachement de microorganismes à partir de ces structures (Guilhen et al., 2017; Hall-Stoodley and Stoodley, 2002) (Figure 6).

La régulation de la formation du biofilm durant ces différentes étapes fait intervenir des voies de signalisations complexes régies par deux principaux acteurs que sont (i) le quorum-sensing en lien avec la densité bactérienne et (ii) la concentration intracellulaire du messager secondaire bactérien, le diguanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP) (Balestrino et al., 2005; Hentzer et al., 2002; Marques et al., 2015; Rossmann et al., 2015). Chez de nombreuses espèces bactériennes, le quorum-sensing est un mécanisme de régulation de l'expression de gène dépendant de la densité cellulaire par le biais de la production et la détection de petites molécules signal appelées autoinducteurs (AI). Ainsi, à partir d'une concentration seuil d'AI au sein de la population bactérienne, des changements dans l'expression de gènes cibles spécifiques conduisent à des modifications phénotypiques. Au sein des différentes espèces bactériennes, le mécanisme du quorum-sensing régule de très nombreux phénotypes, allant de la production de bioluminescence, à la régulation de facteurs de virulence ou la formation de biofilm (Balestrino et al., 2005; Blehert et al., 2003; Xavier and Bassler, 2003). Chez certaines espèces bactériennes, dont *P. aeruginosa*, le quorum-sensing régule la formation de biofilm en modulant la concentration intracellulaire en c-di-GMP (Brindhadevi et al., 2020). La concentration intracellulaire en c-di-GMP est contrôlée par deux classes d'enzymes ayant des activités antagonistes : les diguanylates cyclases (DGC) et les phosphodiesterases (PDE) qui permettent respectivement la synthèse et l'hydrolyse du messager c-di-GMP. Lorsque la concentration intracellulaire en c-di-GMP est élevée, le passage des bactéries d'un état libre à un mode de vie sessile est favorisé, notamment

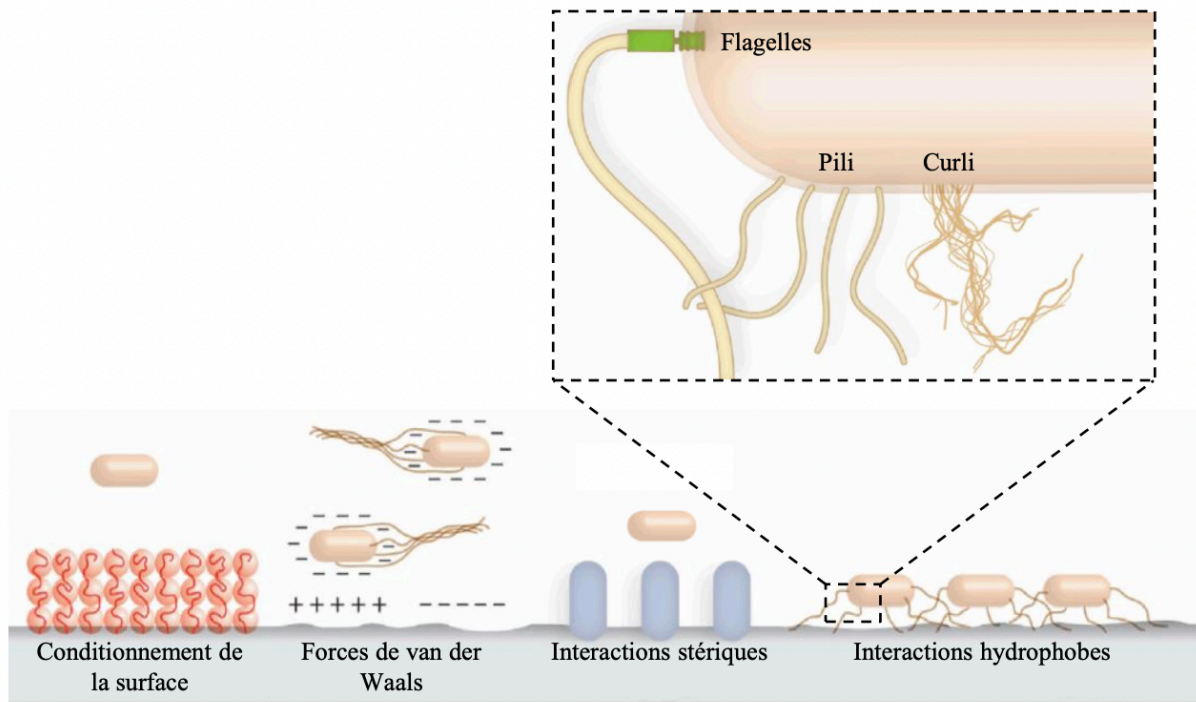


Figure 7 : **Principales interactions bactéries/surface impliquées dans l'adhésion.** L'adhésion initiale des bactéries à une surface est dépendante du conditionnement de celle-ci, ainsi que des forces électrostatiques de van der Waals, des interactions stériques et des interactions hydrophobes. Les différentes organelles présentes à la surface des bactéries (flagelles, pili, curli) jouent un rôle dans ce processus d'adhésion (Adapté de Tuson and Weibel, 2013).

par l'augmentation de l'expression de facteurs d'adhésion, la répression de la mobilité ou la production de matrice extracellulaire (Krasteva et al., 2010; Liu et al., 2022; Newell et al., 2009; Wilksch et al., 2011)

### 2.5.1. L'adhésion

Un des éléments importants précédant le processus d'adhésion des bactéries à un support est le conditionnement des surfaces qui modifie ses propriétés physico-chimiques et conduit éventuellement à une affinité différente des microorganismes pour cette surface (Carpentier and Cerf, 1993). Les bactéries peuvent atteindre ces surfaces « au hasard » par un phénomène de diffusion passive qui met en jeu des mouvements Browniens, ou peuvent entrer en contact grâce à un transport par convection résultant des mouvements de fluide du milieu. Également, certaines bactéries flagellées peuvent mettre en place un mouvement actif lorsqu'elles sont à proximité de surfaces. Il a ainsi été montré que l'augmentation du taux d'adhésion des bactéries *Altermonas sp*, *Alcaligenes sp.* et *Vibrio alginolyticus* est corrélée à leur vitesse de déplacement flagellaire (Morisaki et al., 1999).

La première étape de la formation d'un biofilm consiste en l'adhésion sur un support, qu'il soit abiotique ou biotique. L'adhésion initiale des cellules est une étape très rapide (de l'ordre de la minute) qui dans un premier temps peut être réversible. En effet, une simple force extérieure comme un flux de liquide ou des modifications des propriétés de la surface peut décrocher les bactéries. Différents types de forces opérant entre la surface et les bactéries peuvent intervenir, telles que des forces d'attraction de type van der Waals, des forces électrostatiques (les bactéries chargées négativement interagissent avec des supports chargés positivement) et des interactions stériques et hydrophobes (Hayashi et al., 2003) (Figure 7). Cette étape est également sous le contrôle de structures protéiques ou glycosidiques présentes à la surface des bactéries et qui interagissent directement avec le support. Parmi ces structures, les flagelles jouent un rôle essentiel lors de l'interaction initiale avec la surface, comme cela a été montré pour plusieurs espèces bactériennes (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*...) (O'Toole and Kolter, 1998; Pratt and Kolter, 1998; Watnick et al., 2001). Ces appendices semi-rigides ancrés dans la surface membranaire permettent de passer outre les forces de répulsion entre cellules bactériennes et surfaces. En milieu liquide, ils fournissent une mobilité aux bactéries qui peut être de type « swimming » (Berg and Anderson, 1973) ou « swarming » (Fraser and Hughes, 1999). Il est important de noter que les flagelles ne sont pas une condition indispensable à la formation de biofilm puisque des bactéries non flagellées, comme *K. pneumoniae*, sont capables de former des biofilms.

L'adhésion fait également intervenir diverses structures de type fimbrillaires, aussi appelées pili, présentes à la surface bactérienne. Il s'agit de filaments flexibles de nature protéique qui s'inscrivent dans une grande diversité de famille ; la plus représentée chez les bactéries à Gram-négatif est la

famille « chaperone-usher » (CU). Les pili de type 1 et 3 appartenant à cette famille ont été largement décrits pour leur implication dans l'attachement aux surfaces par des pathogènes tels que *E. coli* et *K. pneumoniae* (Di Martino et al., 2003; Khater et al., 2015; Murphy et al., 2013; Ong et al., 2010; Schilling et al., 2001). Les fimbriae de type CU seront plus amplement décrits dans la section 3 : « Les fimbriae de type chaperone-usher ».

D'autres structures fimbrillaires telles que les curli (pili de type 2) jouent un rôle dans la colonisation de surface. Ces organelles sont des fibres protéiques extracellulaires communément produites par des *Enterobacteriaceae*. Chez *E. coli*, la production de curli se révèle indispensable à l'attachement initial et à la formation de biofilm (Carter et al., 2016). L'analyse de mutants a également montré que ces structures ont une importance dans l'adhésion aux surfaces biotiques (Carter et al., 2016; Cordeiro et al., 2016). Enfin, de nombreux autres éléments membranaires produits par les bactéries, tels que les lipopolysaccharides ou les polysaccharides capsulaires, sont importants pour le processus d'adhésion aux surfaces (Hori and Matsumoto, 2010).

Après un temps de contact initial qui permet la mise en place et l'augmentation des points d'interaction via les différentes structures adhésives, l'adhésion des bactéries à la surface devient irréversible. Cette étape est évidemment dépendante de la production de toutes les structures de surface précédemment décrites mais elle implique également l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la synthèse de polymères organiques tels que des polysaccharides. Bien que certaines familles de composés soient impliquées à la fois dans la formation de biofilm et le processus d'adhésion, plusieurs études indiquent que les polymères produits par les bactéries pour former la matrice du biofilm ne sont pas les mêmes que ceux produits lors de l'adhésion. Par exemple, *Staphylococcus epidermidis* synthétise un polysaccharide (PS/A) spécifique de l'adhésion initiale aux matériaux et un autre polysaccharide (PIA) spécifique des liaisons intercellulaires au sein des biofilms constitués (McKenney et al., 2019).

### 2.5.2. La maturation

L'étape de maturation est la multiplication des bactéries adhérentes pour former des microcolonies. En plus de cette multiplication bactérienne, un aspect caractéristique de la maturation du biofilm est la production de la matrice exopolymérique formant un « ciment » responsable de l'agrégation des bactéries et de la mise en place de la structure tridimensionnelle typique du biofilm mature (Flemming and Wingender, 2010). La phase de maturation est marquée par une profonde modification du profil d'expression génique, avec notamment l'activation de gènes impliqués dans des fonctions de synthèse de composés de la matrice et de réponse aux stress (Beloin et al., 2004; Cordeiro et al., 2016). L'étape de maturation implique également d'autres déterminants bactériens, comme le lipopolysaccharide

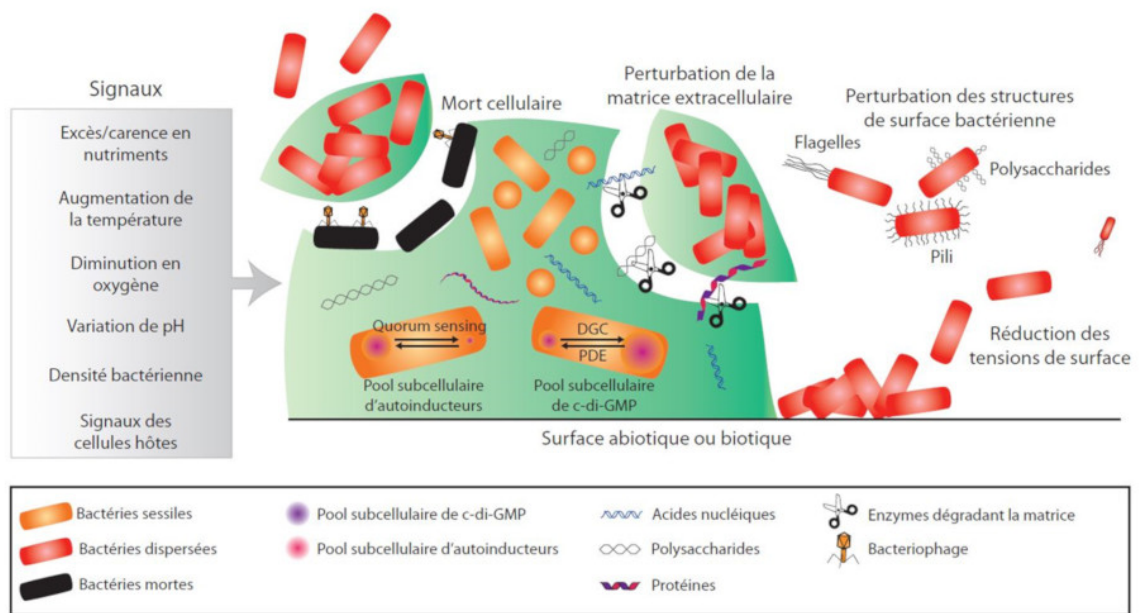


Figure 8 : **Signaux et mécanismes impliqués dans le processus de dispersion.** En réponse à une large gamme de signaux environnementaux (représentés à gauche), certaines bactéries du biofilm induisent le processus de dispersion de façon à quitter la macrostructure qui les entoure. Ces signaux sont transduits à des effecteurs, notamment par la régulation de la concentration intracellulaire de c-di-GMP et d'autoinducteurs. Les stratégies mises en place pour la dispersion incluent notamment la dégradation de la matrice par l'action d'enzymes, la modification des structures de surface des bactéries, la réduction de la tension superficielle par des molécules tensio-actives ou l'induction de la mort cellulaire dans des zones localisées du biofilm (Adapté de Guilhen et *al.*, 2017).

(LPS), la capsule ou les curli. Chez *K. pneumoniae*, le LPS et la capsule sont nécessaires à la construction architecturale du biofilm. Ainsi, un défaut de LPS ou de capsule conduit à une inhibition de la phase de maturation du biofilm et à une absence de structure tridimensionnelle (Balestrino et al., 2008). Chez les souches non muqueuses de *P. aeruginosa*, la production d'alginate est essentielle pour la formation d'un biofilm tridimensionnel ; son absence conduit à la formation d'un biofilm plat et homogène (Wozniak et al., 2003). Enfin, chez *E. coli*, il a été montré que l'absence de curli conduit à la formation d'un biofilm sans structure tridimensionnelle, comparativement à l'architecture structurée observée avec les souches sauvages parentales (Kikuchi et al., 2005).

### 2.5.3. L'étape de dispersion

La désagrégation d'un biofilm mature représente une des étapes clés du développement du biofilm en permettant aux bactéries individuelles ou sous forme de petits agrégats de se libérer de la matrice pour disséminer et coloniser de nouvelles surfaces. Plusieurs mécanismes de décrochement existent et sont divisés en deux catégories : un processus passif (desquamation ou érosion du biofilm) et un processus actif (détachement volontaire initié par la bactérie) (Kim and Lee, 2016). Le décrochement passif consiste en le relargage de bactéries à la suite d'action d'éléments extérieurs tels que des forces de cisaillement exercées par un fluide, le contact avec des particules solides ou le broutage du biofilm par des organismes eucaryotes (Davies, 2011; Petrova and Sauer, 2016). Ce type de processus est souvent appelé « détachement ». Le décrochement actif implique, quant à lui, des mécanismes initiés par les bactéries elles-mêmes. Ce processus, généralement appelé « dispersion », obéit à des processus moléculaires contrôlés génétiquement qui impliquent la détection de signaux environnementaux puis la mise en place de voies de signalisation et d'effecteurs spécifiques (Guilhen et al., 2017; Petrova and Sauer, 2016) (Figure 8). Il n'existe pas de consensus sur la nature des signaux capables de déclencher le processus de dispersion car ils varient en fonction des espèces bactériennes et des dispositifs expérimentaux utilisés. Ils comprennent notamment la disponibilité en nutriment, les changements de conditions physico-chimiques du milieu, la concentration en oxygène et la variation de la densité cellulaire (Guilhen et al., 2017; Petrova and Sauer, 2016) (Figure 8).

Les effecteurs et mécanismes moléculaires qui régissent la dispersion ont principalement été décrits chez *P. aeruginosa* et *Staphylococcus* (Kaplan, 2010; Kim and Lee, 2016; Lister and Horswill, 2014). La perturbation de la matrice extracellulaire via des activités enzymatiques endogènes constitue l'un des mécanismes privilégiés. Ainsi, l'alginate lyase produite par *P. aeruginosa* dégrade l'alginate, un composé majeur de la matrice des biofilms de cette espèce, entraîne une déstabilisation des structures (Boyd and Chakrabarty, 1994). L'activité de certaines protéases chez *Streptococcus mutans* peut également conduire à la dispersion en altérant les structures de surface et adhésines de la bactérie

(Lee et al., 1996; Vats and Lee, 2000). D'autres mécanismes de dispersion décrits sont le « dispersal seeding » qui consiste en l'induction de la mobilité flagellaire suite à la rupture de la matrice, ou la production de biosurfactants (Barraud et al., 2009a, 2009b; Boles et al., 2005; Davies and Marques, 2009; Guilhen et al., 2017) (Figure 8).

Plusieurs études ont analysé les propriétés des bactéries dispersées de biofilm. En effet, en se détachant du biofilm, les cellules bactériennes sont de nouveau confrontées aux pressions environnementales et entrent en compétition avec d'autres bactéries pour la colonisation de nouvelles surfaces. Par des analyses transcriptionnelles, il a été montré que les cellules dispersées sont dans un état physiologique unique, différent des autres modes de vie (Chua et al., 2014; Guilhen et al., 2019; Pettigrew et al., 2014). De plus, les bactéries dispersées présentent une pathogénicité accrue comparativement aux autres formes de vie. Ainsi, la forme dispersée de *Streptococcus pneumoniae* injectée par voie intrapéritonéale dans un modèle murin présente une virulence augmentée comparativement aux cellules des formes biofilm et planctonique (Pettigrew et al., 2014). De la même façon, les bactéries dispersées de biofilm à *K. pneumoniae* ont capacité augmentée à former du biofilm et à coloniser des surfaces biotiques *in vitro* comparativement aux bactéries (Guilhen et al., 2019).

## 2.6. Facteurs d'adhésion et de formation du biofilm

Les processus d'adhésion bactérienne mettent en jeu des interactions entre les bactéries et une surface via des organelles protéiques (Berne et al., 2015). Les bactéries ont développé au cours de leur évolution une variété impressionnante de systèmes de surface et d'adhésines pour faciliter l'attachement et la colonisation des surfaces. Chez les bactéries, ces structures peuvent être de type fimbrial, de type non-fimbrial ou d'autres adhésines polysaccharidiques. Parmi les systèmes d'adhésion les plus décrits, on retrouve les adhésines fimbriales qui jouent principalement un rôle dans l'attachement aux surfaces biotiques et abiotiques. Ces structures fimbriales peuvent aussi être impliquées dans la mobilité, le transfert d'ADN et la formation de biofilm. Le terme « fimbriae », qui en latin signifie fibre, a été inventé par Duguid et ses collaborateurs pour décrire ces structures bactériennes, mais le terme « pili », du latin cheveux, est également largement utilisé (Duguid et al., 1955). En 1975, Ottow a suggéré que le terme « pili » soit réservé aux structures jouant un rôle dans les processus de transfert horizontal d'ADN et le terme « fimbriae » pour les structures impliquées dans les processus d'attachement (Ottow, 1975). Bien que cette recommandation n'ait jamais réellement été suivie dans la littérature, le terme « fimbriae » sera majoritairement employé dans cette partie.



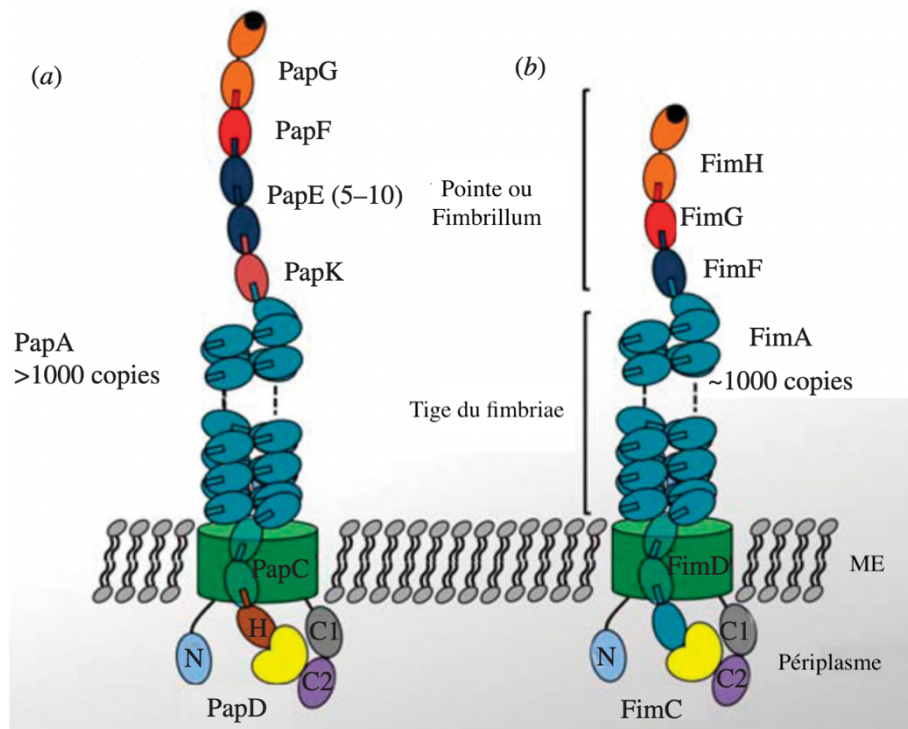


Figure 9 : **Représentation générale des fimbriae de type CU.** Les deux exemples de fimbriae CU présentés dans cette figure sont les fimbriae de type P (*pap*) (a) et de type 1 (*fim*) (b). Les adhésines PapG et FimH (colorées en orange) présentes au sommet des fimbriae et les sous-unités mineures (PapF, PapE et PapK pour le fimbriae de type P ; FimG et FimF pour le fimbriae de type 1) (colorées en rouge et en bleu foncé) forment avec l'adhésine la pointe du fimbriae appelée fimbrillum. Les sous-unités majeures, PapA et FimA (colorées en bleu), forment la tige du fimbriae. Au niveau de la membrane externe, une sous-unité de terminaison (colorée en marron), PapH, est présente pour le fimbriae de type P. La protéine chaperone (colorée en jaune), présente dans le périplasma et attachée à la dernière sous-unité assemblée de chaque fimbriae, permet le repliement des sous-unités fimbriales et leur adressage à la membrane. La protéine usher (colorée en vert) est ancrée dans la membrane externe (ME) et permet l'assemblage du fimbriae à la surface ; elle possède des domaines de fixation N-terminal (N) et C-terminal (C1 et C2) permettant la liaison de la protéine chaperone (D'après Busch and Waksman, 2012).

Beaucoup d'espèces bactériennes possèdent plus d'un type de fimbriae et ces systèmes peuvent être divisés en quatre sous-groupes en fonction de leur processus d'assemblage : les fimbriae de la famille « chaperone-usher », les fimbriae de type IV, la voie d'assemblage alternatif des « chaperone-usher » et la voie de nucléation-précipitation extracellulaire ou voie d'assemblage des curli (Berne et al., 2015). Les fimbriae assemblés par la voie « chaperone-usher » (CU pour « Chaperone-Usher ») sont uniquement présents chez les bactéries à Gram-négatif où ils forment la famille d'appendices bactériens la plus abondante. Les rôles principaux de ces fimbriae sont l'adhésion aux cellules hôtes et la formation de biofilm, ce qui en fait des facteurs de pathogénicité majeurs. Uniquement les systèmes de type chaperone-usher seront décrits dans ce manuscrit.

### 3. Les fimbriae de type chaperone-usher

#### 3.1. Architecture générale et composants des fimbriae CU

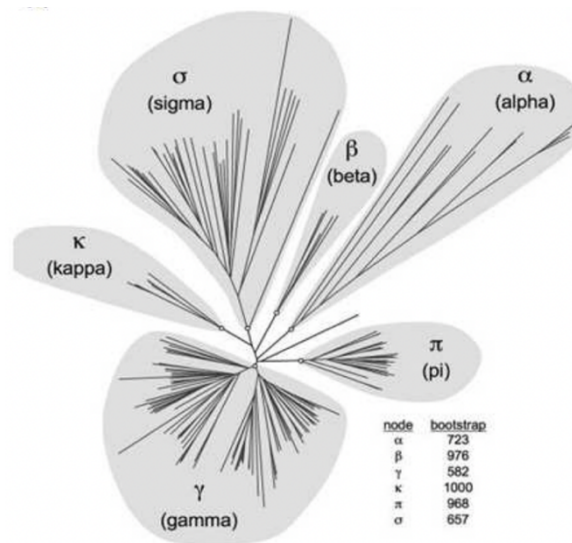
Les structures fimbriales assemblées par la voie CU sont composées par la répétition d'une sous-unité majeure avec des sous-unités mineures, incluant l'adhésine à l'extrémité distale du fimbriae qui permet la reconnaissance spécifique des composants cellulaires ou des surfaces cibles. Les fimbriae sont assemblés par un système dédié appelé « chaperone-usher », qui représente le système de sécrétion le plus abondant chez les bactéries à Gram-négatif. Il est composé d'une protéine chaperone périplasmique et d'une protéine de la membrane externe appelée usher. La chaperone empêche notamment l'auto-agrégation des sous-unités du pili dans le périplasme, et les dirige vers la protéine usher, qui est alors impliquée dans la sécrétion et l'assemblage correct des sous-unités du fimbriae sur la face extracellulaire ; le fimbriae s'allonge alors par extrusion (Geibel and Waksman, 2014). Les fimbriae varient en taille et en forme. Ce peut être une longue tige rigide en forme d'hélice, qui correspond à la morphologie la plus classique de cette famille de fimbriae, ou une tige fine et flexible pouvant parfois former des structures indéfinies similaires aux polysaccharides de la capsule. Les fimbriae de type 1 et les fimbriae de type P, tous deux largement décrits chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, sont de parfaits prototypes des structures dites classiques des fimbriae CU (Figure 9). Pour cette raison, seuls ces deux types de fimbriae seront détaillés par la suite (Werneburg and Thanassi, 2018).

Ces fimbriae sont constitués de différents types de sous-unités protéiques arrangées en deux sous-assemblages : une tige et une pointe appelée fimbrillum. La tige est composée d'un assemblage de polymères linéarisés, les sous-unités fimbriales ou pilines ; elles forment une hélice d'un diamètre d'environ 7 ou 8 nm. La tige du fimbriae est composée de centaines voire de milliers de copies de la sous-unité majeure, FimA pour le fimbriae de type 1 et PapA pour le fimbriae de type P (Waksman and Hultgren, 2009; Werneburg and Thanassi, 2018) (Figure 9). La tige du fimbriae de type P est polymérisée en hélices de 3,3 sous-unités majeures PapA par tour. Sa partie proximale, accrochée à la

membrane, se termine par une copie d'une sous-unité de terminaison PapH et le haut de la tige est relié à la pointe par une sous-unité adaptatrice PapK. Le fimbrillium, qui correspond à la pointe flexible du fimbriae, a un diamètre d'environ 2 nm, comprend plusieurs sous-unités protéiques dont l'adhésine du système. Pour le fimbriae de type P, il est composé de 5 à 10 copies de la sous-unité PapE, suivies d'une copie de la sous-unité adaptatrice PapF puis une copie de l'adhésine PapG (Båga et al., 1987; Verger et al., 2006) (Figure 9). Le fimbriae de type 1 présente une architecture similaire mais légèrement plus simple. La tige du fimbriae de type 1 est polymérisée en hélices de 3,4 sous-unités majeures FimA par tour (Hahn et al., 2002). Le fimbrillium de la pointe du fimbriae est constitué d'une copie des sous-unités FimF et FimG et d'une copie de l'adhésine FimH (Waksman and Hultgren, 2009) (Figure 9). À ce jour, aucune sous-unité de terminaison n'a encore été clairement identifiée pour le fimbriae de type 1, mais la protéine FimI pourrait remplir ce rôle (Rossolini et al., 1993; Valenski et al., 2003). Les fimbriae de type 1 et de type P sont dits monoadhésifs car ils ne possèdent qu'une seule sous-unité protéique avec des propriétés adhésives (Zav'yalov et al., 2010). En comparaison, il existe des fimbriae dits polyadhésifs qui possèdent des adhésines non seulement sur la pointe mais également le long de la partie exposée du corps du fimbriae (Pettigrew et al., 2004; Piatek et al., 2005; Zavialov et al., 2007).

### 3.2. Classification des systèmes chaperone-ushe

Dans la famille des systèmes CU, l'assemblage du fimbriae à la surface implique l'export des sous-unités fimbriales via l'action d'une protéine chaperone périplasmique et d'une protéine de membrane externe appelée « l'usher ». Les typages sérologiques et les observations microscopiques ont permis d'établir les premiers schémas de classification des fimbriae basés sur leur sérotype, leur morphologie, voire leur fonction. Une classification phylogénétique basée sur la comparaison des séquences protéiques s'est par la suite révélée plus efficace et a permis de définir des groupes de fimbriae en fonction de leur ancêtre commun. Ces classifications sont basées sur la comparaison des séquences protéiques des sous-unités structurales ou des protéines accessoires des systèmes CU (Chattopadhyay et al., 2012; Nuccio and Bäumler, 2007). Un schéma de classification basé sur la comparaison des séquences des sous-unités majeures a été construit et a permis de distinguer la famille CU (groupes 1, 2 et 3) des autres types de fimbriae qui comprennent la voie d'assemblage alternatif CU (groupe 5), les fimbriae de type IV (groupe 4) et les curli (groupe 6) (Neidhardt, 1996). Cependant, certains opérons de systèmes CU codent plusieurs sous-unités différentes ; utiliser comme seul critère de regroupement la séquence des sous-unités fimbriales est alors problématique puisque deux sous-unités différentes d'un même opéron CU peuvent se grouper à deux branches distinctes d'un arbre phylogénétique et conduire à des regroupements aberrants (Nuccio and Bäumler, 2007). Une classification basée sur les



Division majeure	Clade	Sous-clade	Domaines des sous-unités	Famille de chaperone	Organisation
CU alternative	α		PFAM04449	FGS	CMUT
	β		PFAM06551		MCU
CU classique	γ	γ3	PFAM04619 PFAM06443 PFAM05775	FGL	MCU ou CUM
		γ1	PFAM00419 COG3539 PFAM02432	FGS	MCUT
		γ2			MCCU
		γ4			MCUT
	π	MUCT			
κ	MCU				
CU archaïque	σ		COG3539		MCUT

■ M : Sous-unité majeure □ C : Chaperone ▒ U : Usher ■ T : Fimbrial tip

Figure 10 : **Arbre phylogénétique et classification des différentes familles de fimbriae CU.** Arbre phylogénétique représentant les différentes familles de protéine « usher » (panel haut) et tableau récapitulatif de la classification des fimbriae CU (panel bas). L'arbre phylogénétique non enraciné des systèmes CU a été généré à l'aide de séquences en acides aminés de protéines usher. Les fimbriae sont regroupés en six clades (surlignés en gris) appelés α, β, γ, κ, π et σ. Le tableau de classification des CU représente les divisions, les clades, les sous-clades, les domaines protéiques conservés des sous-unités majeures, les familles de chaperones (FGS pour les chaperones à boucles courtes et FGL pour les chaperones à boucle longue) impliquées, ainsi que le type d'organisation des opérons et les représentations schématiques correspondantes (Adaptée de Nuccio and Bäumler, 2007).

protéines chaperones des systèmes, et notamment sur la longueur de la séquence en acide aminé d'une boucle de la protéine, a également été développée grâce à une modélisation informatique de leur structure tridimensionnelle. Cette classification a divisé les fimbriae CU en deux sous-familles en fonction de la longueur d'une boucle interne F1-G1 qui peut être courte (sous-famille FGS) ou longue (sous-famille FGL). Une phylogénie basée sur la comparaison des séquences protéiques des chaperones de ces deux groupes a révélé que ce schéma de classification n'est pas assez précis pour construire des sous-groupes permettant de catégoriser l'ensemble des systèmes CU à partir de l'analyse de ces protéines. De plus, cette classification basée sur les protéines chaperone semble également peu pertinente car un opéron CU peut coder plus d'une protéine chaperone, ce qui pose la question de quelle chaperone choisir.

Au vu des limites des classifications précédemment décrites, le schéma de classification des fimbriae CU le plus pertinent prend en compte la comparaison des séquences protéiques des protéines ushers. Puisque chaque opéron fimbrial de type CU ne comprend qu'une seule protéine usher, comparativement aux autres éléments protéiques du système, ce schéma de classification a l'avantage de définir des groupes phylogénétiques précis et non ambigus. Une comparaison initiale basée sur un alignement multiple de 58 séquences de protéines usher (via le logiciel CLUSTAL) a mis en évidence 10 groupes, qualifiés de clusters par les auteurs (Yen et al., 2002). Une seconde version améliorée de cet arbre phylogénétique a été construite par comparaison cette fois de 189 séquences protéiques d'usher comprenant les domaines PFAM00577 et/ou COG3188. Pour cette phylogénie, les 189 séquences d'usher incluses dans l'analyse ont été vérifiées comme faisant partie d'une séquence génomique où la totalité de l'opéron, et donc les gènes codant les autres protéines du système, était présent. Cette classification a permis d'obtenir 6 groupes, proches mais non identiques à ceux proposés dans la classification comprenant 58 protéines usher. Pour éviter toutes confusions, les auteurs ont choisi de séparer les différents groupes phylogénétiques en « clades », nommés selon une nomenclature basée sur l'alphabet grec. Cette classification, utilisée actuellement, a permis de constituer ainsi six clades individuels : fimbriae- $\alpha$ , fimbriae- $\beta$ , fimbriae- $\gamma$ , fimbriae- $\kappa$ , fimbriae- $\pi$  et fimbriae- $\sigma$  (Nuccio and Bäumler, 2007) (Figure 10). Le clade fimbriae- $\gamma$  comprenant des sous-groupes phylogénétiques distincts a ensuite été subdivisé en quatre sous-clades, nommés de 1 à 4 ( $\gamma_1$  à  $\gamma_4$ ). Le fimbriae P et le fimbriae de type 1 d'*E. coli* font respectivement partie des clades  $\pi$  et  $\gamma_1$  (Figure 10). Cette classification phylogénétique basée sur les protéines usher est en corrélation avec l'organisation des gènes dans le reste de l'opéron codant les fimbriae CU. Les clades - $\alpha$  et - $\sigma$  sont classés dans la phylogénie des systèmes CU mais ne font pas partie de la voie d'assemblage « classique » puisqu'ils correspondent respectivement aux voies alternative et archaïque. Ces deux voies ne seront pas décrites dans ce manuscrit.

### 3.3. Organisation génomique et diversité des systèmes CU

Les gènes impliqués dans la biosynthèse des fimbriae de type CU sont organisés au sein d'opérons plasmidiques ou chromosomiques (Werneburg and Thanassi, 2018). Ils codent les trois éléments principaux : (i) la chaperone périplasmique, (ii) la protéine usher et (iii) au minimum une protéine de sous-unité fimbriale.

Les six clades de la classification des fimbriae CU cités précédemment peuvent être répartis en quatre groupes monophylétiques, en fonction de l'organisation des gènes au sein de leur opéron et des relations évolutives entre les séquences protéiques de leurs sous-unités fimbriales. Le premier, qui rassemble les clades  $-\gamma$ ,  $-\kappa$ , et  $-\pi$ , est caractérisé par un domaine homologie protéique (PFAM00419). Les trois autres groupes correspondent au clade  $-\beta$  caractérisé par le domaine homologie protéique PFAM06551, au clade  $-\alpha$  caractérisé par le domaine homologie protéique PFAM04449 et au clade  $-\sigma$  caractérisé par le domaine homologie protéique COG5430 (Figure 10). Les clades  $-\kappa$  et  $-\pi$  partagent une même organisation de gènes dans leur opéron, avec le gène codant la sous-unité majeure suivie de ceux codant l'usher et la protéine chaperone. Cette structure d'organisation est dite MUC - nomenclature où les lettres correspondent à un type de protéine du système CU (M : sous-unité majeure, U : usher, C : chaperone et T : adhésine (tip en anglais)) et sont présentées dans le même ordre que les gènes codant pour ces protéines au sein de l'opéron. Les fimbriae du clade  $-\gamma$  n'ont pas tous la même organisation avec une structure différente entre chaque sous-clade (de 1 à 4) : le clade  $-\gamma_1$  possède un type d'organisation génomique qui suit une structure MCUT, le clade  $-\gamma_2$  possède un type d'organisation génomique qui suit une structure MCCU, le clade  $-\gamma_3$  possède un type d'organisation génomique qui suit une structure MCU ou CUM et enfin le clade  $-\gamma_4$  possède un type d'organisation génomique qui suit une structure MCUT. Les clades  $-\alpha$ ,  $-\beta$ , et  $-\sigma$  présentent des structures d'organisation différentes, respectivement de type CMUT, MCU et MCUT (Busch and Waksman, 2012) (Figure 10). La présence de gènes supplémentaires, donnant une organisation génomique divergente des structures (MUCT) décrites pour chaque cluster, peut probablement résulter d'un événement de duplication de gène (Busch and Waksman, 2012; Nuccio and Bäumlér, 2007).

Les opérons codant les fimbriae CU sont fréquemment localisés à proximité d'autres gènes codant des facteurs de pathogénicité, formant ainsi des îlots de pathogénicité. Comme de nombreux facteurs de virulence, les systèmes CU proviennent souvent d'acquisition par transfert horizontal de gènes (Oelschlaeger et al., 2002). L'acquisition des fimbriae CU par des transferts horizontaux de gènes entre différents microorganismes de la même espèce ou d'espèces différentes rend difficile la compréhension des relations phylogénétiques entre bactéries à partir de ces éléments et le suivi de

leur histoire évolutive. Pour cette raison, le rapprochement des séquences protéiques correspondant à différents opérons fimbriaux à l'aide d'une classification définie peut aider à prédire leur scénario évolutif et leur morphologie (Nuccio and Bäumler, 2007). Il a été montré que l'évolution des clusters de gènes fimbriaux par transfert horizontal de gènes chez l'espèce *Salmonella* aboutit à des combinaisons uniques d'opérons fimbriaux par sérotypes de l'espèce (Bäumler, 1997). En effet, comme d'autres facteurs de virulence, il est possible d'envisager que l'acquisition rapide de fimbriae CU fournit une forte plasticité génomique aux bactéries et leur permet de s'adapter rapidement à une variation de leur environnement (Juhas, 2015). Ce phénomène d'acquisition des fimbriae est probablement l'un des mécanismes facilitant la colonisation d'une gamme d'hôte et de divers sites environnementaux par les bactéries (Bäumler, 1997; Cheng and Wiedmann, 2021).

#### 3.4. Mécanismes d'assemblage des fimbriae de la voie CU

Tous les fimbriae assemblés par la voie CU partagent un mécanisme de biogénèse commun qui dépend d'une protéine chaperone dédiée à cette voie d'assemblage et d'un canal protéique de sécrétion-assemblage localisé dans la membrane externe appelé usher. La biosynthèse du fimbriae à la surface bactérienne a lieu en absence de source d'énergie comme de l'ATP (Jacob-Dubuisson et al., 1994; Thanassi et al., 2005). Des interactions protéine-protéine successives entre les différentes protéines du système CU conduisent à la sécrétion et l'assemblage des différents éléments du fimbriae dans un ordre défini. Les sous-unités fimbriales sont ainsi excrétées à la surface de la bactérie, en commençant par celles retrouvées sur la partie distale de l'organelle et en finissant par celles qui resteront ancrées dans la membrane une fois la synthèse terminée (Werneburg and Thanassi, 2018). Les sous-unités fimbriales sont synthétisées initialement avec une séquence signal N-terminale qui leur permet de traverser la membrane interne via le système général SecYEG (Jones et al., 1997). Dans le périplasme, la séquence signal est clivée et les sous-unités protéiques acquièrent une structure repliée grâce à la formation de liaisons disulfures via l'action de l'oxydoréductase DsbA. Cette enzyme a été décrite comme nécessaire dans le processus d'assemblage de différents types de fimbriae, comme les fimbriae de type P dans des souches *E. coli* uropathogènes ou les fimbriae de type IV de *Neisseria meningitidis* (Jacob-Dubuisson et al., 1994; Tinsley et al., 2004; Totsika et al., 2009). Dans le périplasme, les sous-unités sont alors prises en charge par les protéines chaperones par un mécanisme appelé « complémentation du brin donneur » et sont assemblées par un mécanisme « d'échange du brin donneur ».

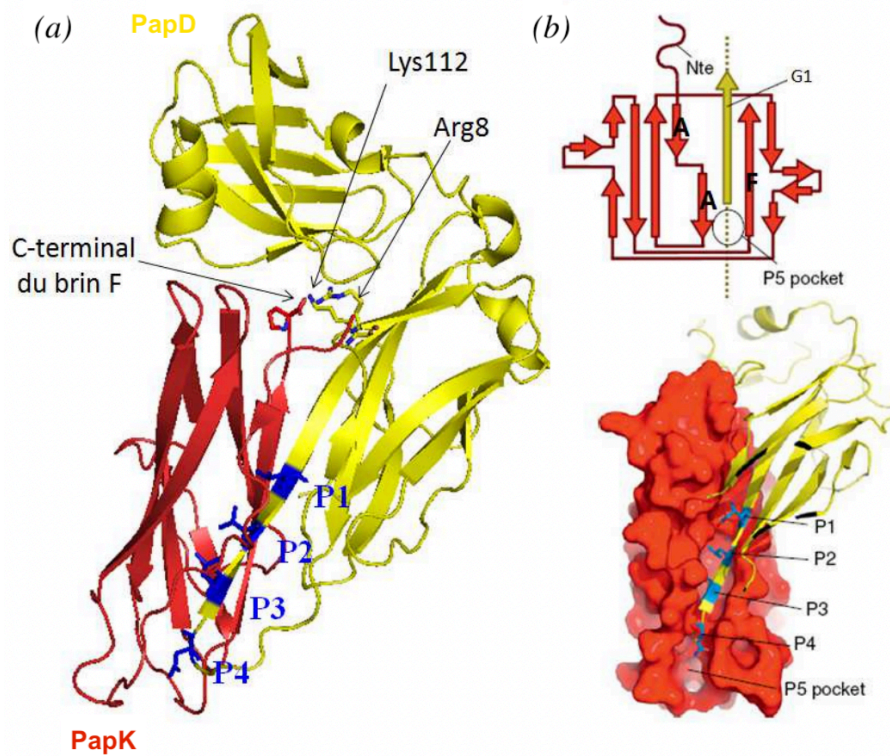


Figure 11 : **Mécanisme de complémentation du brin donneur.** (a) Représentation 3D de la structure du complexe formé par la chaperone PapD (en jaune) et la sous-unité PapK (en rouge). Les résidus hydrophobes P1, P2, P3 et P4 du brin  $\beta$  G1 donneur de la chaperone sont représentés en bleu. Les résidus Arginine 8 (Arg8) et Lysine 112 (Lys112), responsables du bon positionnement du domaine C-terminal du brin  $\beta$  F de la sous-unité fimbriale, sont indiqués par les flèches (D'après Sauer et *al.*, 2002). (b) Représentation schématique, d'après la cristallographie, du processus d'insertion du brin  $\beta$  G1 de la chaperone dans le sillon hydrophobe d'une sous-unité, occupant les poches P1 à P4 et laissant la poche P5 libre (Adaptée de Allen et *al.*, 2012).



### 3.4.1. Stabilisation des sous-unités par « complémentation du brin donneur »

Les sous-unités fimbriales sont composées d'un domaine piline caractérisé par un repliement de type immunoglobuline (Ig) qui consiste classiquement en un feuillet  $\beta$  composé de 7 brins (A à G). Contrairement à une structure Ig classique, le domaine piline des sous-unités fimbriales ne possède pas le 7<sup>e</sup> brin  $\beta$  C-terminal (brin G) et n'est composé que de 6 brins  $\beta$  (A à F) (Sauer et al., 1999). Cette absence du 7<sup>e</sup> brin génère un sillon hydrophobe au niveau des sous-unités, ce qui leur confère une instabilité (Barnhart et al., 2000; Vetsch et al., 2004). Dans le périplasme, la protéine chaperone se lie à la sous-unité fimbriale en comblant ainsi ce sillon hydrophobe avec son brin  $\beta$  G1, lui donnant ainsi une stabilité provisoire. Ce processus de transfert d'un brin  $\beta$  au niveau du périplasme est nommé « complémentation du brin donneur ». Les sous-unités non prises en charge par une chaperone ne sont pas stabilisées et s'agrègent avant d'être dégradées par la protéase DegP (Barnhart et al., 2000; Jones et al., 1997; Vetsch et al., 2004).

La protéine chaperone, d'environ 25 kDa, est composée de deux domaines de type Ig orientés en L (ou en forme de boomerang). Ces deux domaines sont composés de 7 brins  $\beta$  (A1-G1 et A2-G2) repliés en  $\beta$ -barrel (un feuillet  $\beta$  enroulé sur lui-même) (Eidam et al., 2008). Les brins F1 et G1 de la chaperone sont reliés par une boucle variable en longueur qui définit l'appartenance de la chaperone à la classe FGS (boucle F1-G1 courte) ou à la classe FGL (boucle F1-G1 longue) (Figure 10). Les chaperone FGS ont ainsi une boucle de 10 à 20 acides aminés contre 21 à 29 pour les chaperones FGL (Hung et al., 1996; Sauer et al., 2004). La surface d'interaction de la chaperone avec la sous-unité fimbriale comprend deux résidus, l'arginine 8 et la lysine 112, situés entre les deux domaines Ig. Ces 2 résidus sont responsables du bon positionnement du brin F de la sous-unité fimbriale lors de la formation du complexe chaperone/sous-unité (Slonim et al., 1992) (Figure 11). Sur le brin  $\beta$  G1 donneur de la chaperone, un motif composé de quatre résidus hydrophobes (P1, P2, P3 et P4) va se loger dans les poches hydrophobes (P1, P2, P3 et P4) présentes sur le sillon de la sous-unité fimbriale (Waksman and Hultgren, 2009) (Figure 11). La poche P5 du sillon de la sous-unité reste libre. Le brin  $\beta$  donneur G1 de la chaperone est orienté de façon parallèle au brin  $\beta$  F de la sous-unité, ce qui est un repliement atypique puisque sur une immunoglobuline classique les brins  $\beta$  F et G sont antiparallèles (Werneburg and Thanassi, 2018) (Figure 11). Dans cette conformation, la sous-unité fimbriale est en attente de polymérisation avec sa poche hydrophobe P5 accessible pour le remplacement du brin  $\beta$  de la chaperone par l'extrémité N-terminale d'une nouvelle sous-unité fimbriale (Busch and Waksman, 2012).

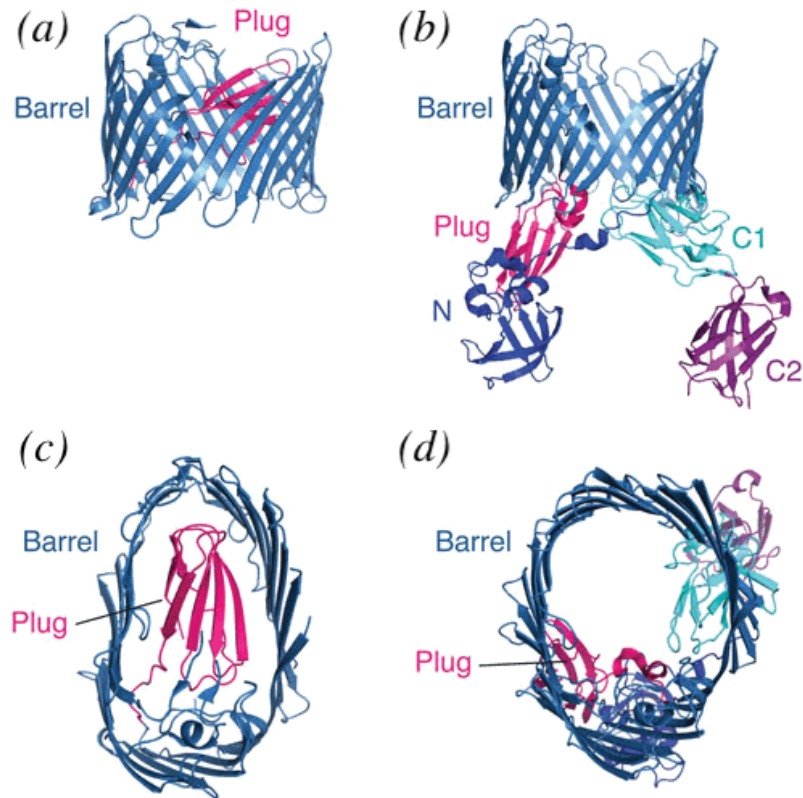


Figure 12 : **Structure de la protéine usher FimD du fimbriae de type 1 en phase inactive et active.** La structure de l'usher FimD sous sa forme inactive est représentée en vue de côté (a) et en vue de haut (c). Le domaine formant le canal transmembranaire en  $\beta$ -barrel est représenté en bleu clair. Le domaine plug qui sert de bouchon, représenté en rose, est positionné au centre et latéralement par rapport au domaine  $\beta$ -barrel fermant ainsi le pore de l'usher. La structure de l'usher FimD sous sa forme active est représentée en vue de côté (b) et en vue de haut (d). Le canal transmembranaire et le domaine plug sont représentés avec les mêmes couleurs que dans les panels (a) et (c). Lors de la phase d'activation de l'usher, le domaine plug est « expulsé » du pore et se retrouve dans le périplasme à proximité du domaine de fixation N-terminal (N ou NTD) (en bleu foncé) et des deux domaines de fixation C-terminal C1 et C2 (en cyan (C1 ou CTD1) et en violet (C2 ou CTD2)) (Adaptée de Werneburg and Thanassi, 2018).

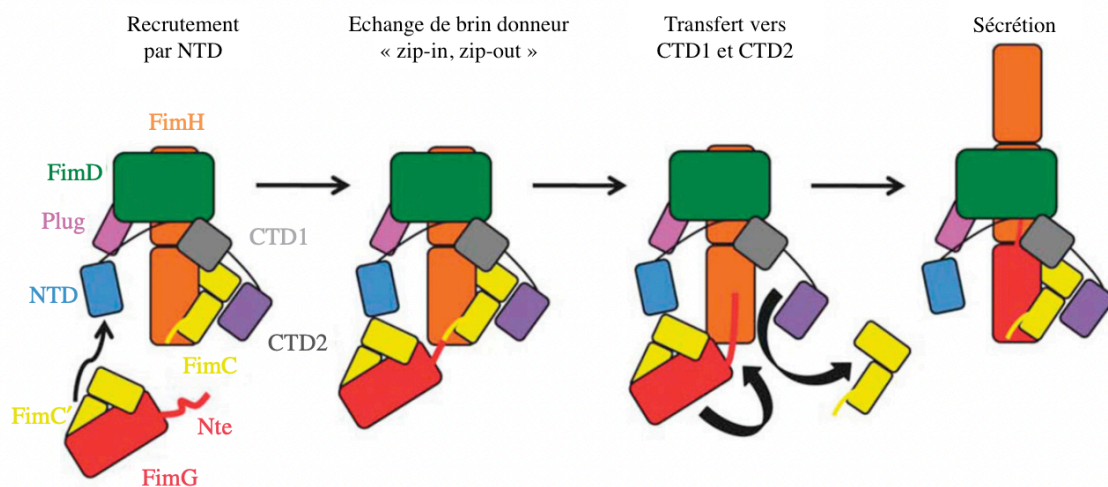


Figure 13 : **Mécanisme d'échange du brin donneur.** Représentation schématique du mécanisme d'échange de brin donneur conduisant à l'assemblage et la sécrétion du fimbriae à la surface. La première étape d'assemblage du fimbriae n'est pas représentée ici, mais elle consiste à ce qu'un premier complexe chaperone/sous-unité (colorée en jaune et en rouge, respectivement) se fixe au niveau du domaine NTD (coloré en bleu), ce qui active la protéine usher et induit l'ouverture du canal (coloré en vert) afin d'accueillir les sous-unités fimbriales repliées. Le complexe chaperone/sous-unité est alors transféré vers les domaines CTDs (colorés en gris et violet) de l'usher. Le domaine NTD est donc libre pour recruter un nouveau complexe chaperone/sous-unité dans le périplasma. Un second complexe chaperone/sous-unité se fixe alors sur le domaine NTD de l'usher. Le brin  $\beta$  G1 fourni par la chaperone du premier complexe à sa sous-unité va être remplacé par une extension peptidique de l'extrémité N-terminal (Nte) de la sous-unité majeure du second complexe chaperone/sous-unité. La protéine chaperone du premier complexe n'est alors plus liée à sa sous-unité, et elle est libérée dans le périplasma. Le second complexe chaperone/sous-unité peut à son tour être transféré vers les domaines CTDs de l'usher (Adapté de Busch and Waksman, 2012).

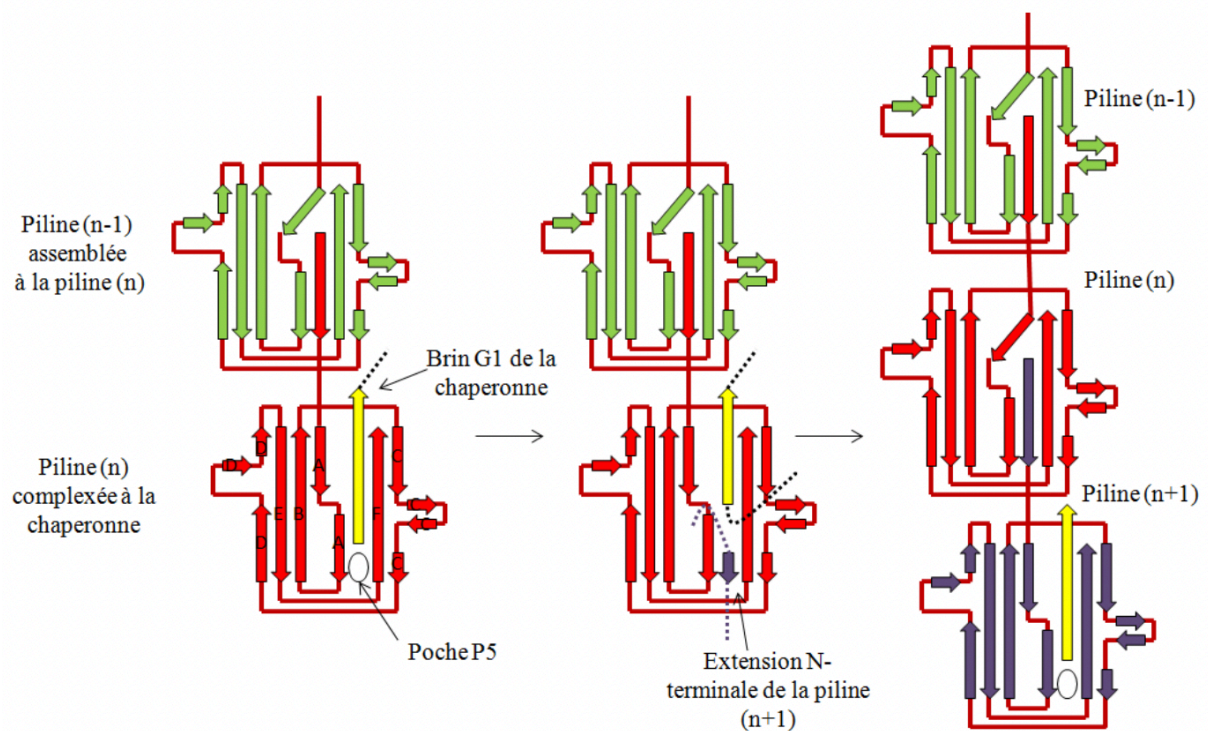


Figure 14 : **Représentation topologique du mécanisme d'échange du brin donneur.** La figure représente schématiquement les sous-unités fimbriales lors de l'assemblage du fimbriae par le mécanisme d'échange de brin donneur. Lors de ce mécanisme, les sous-unités fimbriales (ou piline) sont assemblées entre elles au niveau du pore formé par l'usher de façon à mettre en place le fimbriae à la surface de la cellule. Sur le schéma de gauche, le système comprend une piline (n-1) (représentée en vert) reliée à une autre piline (n) (représentée en rouge). La piline (n) est encore complexée avec le brin  $\beta$  G1 d'une protéine chaperone (flèche jaune). La poche hydrophobe P5 de la piline (n) étant libre, le résidu P5 de l'extension N-terminale (Nte) (petite flèche bleue) de la piline (n+1) va pouvoir s'y insérer. Le brin  $\beta$  G1 fourni par la chaperone (flèche jaune) à la piline (n) va être remplacé par le brin de l'extension Nte de la piline (n+1) (représentée en bleu) qui se positionne de façon antiparallèle au brin  $\beta$  F de la piline (n) (Adapté de Sauer et *al.*, 2002 ; Allen et *al.*, 2012).

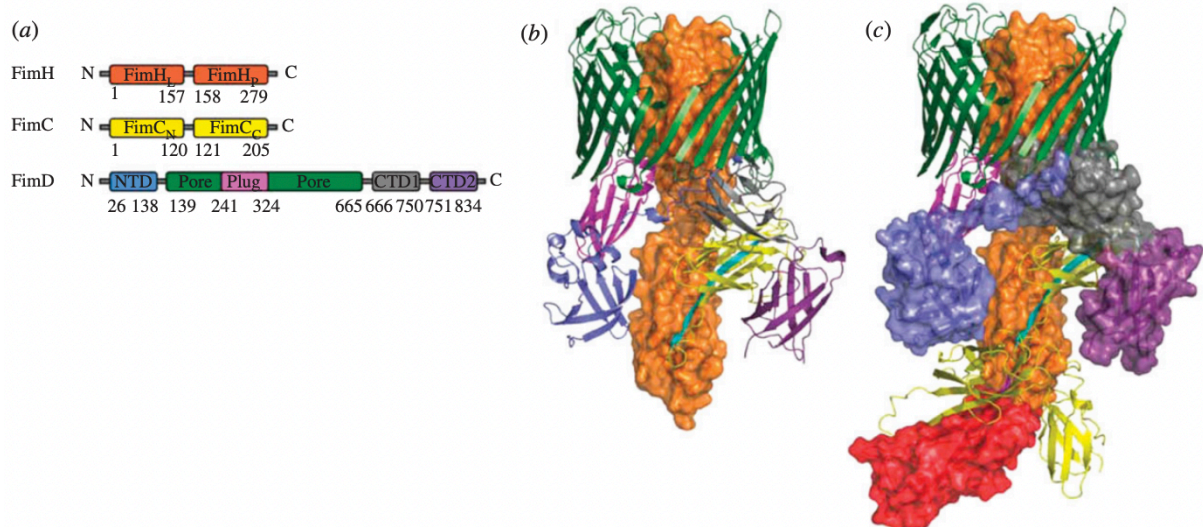


Figure 15 : **Structure du complexe usher-chaperone-adhésine.** La figure représente le complexe usher-chaperone-adhésine lors de l'assemblage du fimbriae de type 1 (*fim*). (a) Schématisation des domaines protéiques de l'adhésine FimH, de la chaperone FimC et de l'usher FimD. Les numéros correspondent à la numérotation des résidus bordant les différents domaines. (b) Représentation en ruban et surface du complexe FimD-FimC-FimH. Les deux sous-unités correspondant aux adhésines FimH sont représentées en orange, la chaperone FimC est représentée en jaune et le canal de l'usher FimD est représenté en vert. Les domaines de fixation de l'usher, N-terminal (NTD) et C-terminal (CTD1 et CTD2) sont respectivement représentés en bleu clair, gris et violet. Le domaine plug est représenté en rose. Le brin  $\beta$  G1 de la chaperone FimC, coloré en cyan, complète le sillon hydrophobe (comprenant les poches P1 à P4) de l'adhésine FimH. (c) Représentation similaire à la précédente mais avec superposition d'un complexe chaperone FimC/sous-unité mineure FimG se fixant au domaine N-terminal (NTD) de l'usher, ce qui conduit au cycle d'assemblage des sous-unités dit « d'échange de brin donneur ». Le résidu P5 de l'extension N-terminale (Nte) de la sous-unité entrante vient se loger dans la poche hydrophobe P5, colorée en violet, de la sous-unité précédemment assemblée (Adaptée de Busch and Waksman, 2012).

### 3.4.2. Assemblage des sous-unités par « échange du brin donneur »

Les complexes chaperone/sous-unités formés au niveau périplasmique sont ensuite recrutés au niveau de la protéine us her insérée dans la membrane externe. La protéine us her permet la polymérisation des différentes sous-unités fimbriales, mais c'est également le pore sécrétoire responsable de leur translocation à la surface externe pour former la structure définitive. L'us her est constitué d'environ 800 résidus protéiques distribués en quatre domaines comprenant (i) un domaine N-terminal périplasmique d'environ 125 résidus (NTD) qui constitue le premier site de recrutement du complexe chaperone/sous-unité, (ii) un large domaine central d'environ 500 résidus formant le pore de translocation membranaire composé de 24 brins repliés en  $\beta$ -barrel, (iii) deux domaines C-terminaux (CTD1 et CTD2) d'environ 170 résidus constituant le second site de fixation du complexe chaperone/sous-unité et enfin (iv) un domaine « plug » d'environ 110 résidus qui sert de bouchon pour bloquer le pore non utilisé (Capitani et al., 2006a, 2006b; Nishiyama et al., 2003; Thanassi et al., 1998) (Figure 12). Ce domaine « plug » permet de limiter les entrées ou sorties de protéines non-spécifiques via l'us her. Les domaines NTD et CTD de l'us her constituent les sites de fixation du complexe chaperone/sous-unité et un mécanisme de contrôle permet de s'assurer qu'une chaperone seule ne puisse pas se fixer à l'us her (Werneburg and Thanassi, 2018) (Figure 12).

Pour initier l'assemblage du fimbriae, un premier complexe chaperone/sous-unité se fixe au niveau du domaine NTD, ce qui active la protéine us her et induit l'ouverture du canal afin d'accueillir, via une interaction avec son domaine NTD, les sous-unités fimbriales repliées (Phan et al., 2011). Le complexe chaperone/sous-unité est alors transféré vers les domaines CTDs de l'us her. Ce transfert se fait grâce à un différentiel d'affinité ; l'affinité du domaine N-terminal pour le complexe chaperone/sous-unité est plus faible que celle des domaines C-terminaux (Werneburg et al., 2015) (Figure 13). Le domaine NTD est libre pour recruter un nouveau complexe chaperone/sous-unité dans le périplasme. Un second complexe chaperone/sous-unité se fixe alors sur le domaine NTD de l'us her. Le brin  $\beta$  G1 fourni par la chaperone du premier complexe à sa sous-unité lors du mécanisme de « complémentation du brin donneur » va être remplacé par une extension peptidique de l'extrémité N-terminale (Nte) de la sous-unité majeure appartenant au second complexe chaperone/sous-unité (Figures 13 et 14). La protéine chaperone du premier complexe n'est ainsi plus liée à la sous-unité, et est alors libérée dans le périplasme. Ce mécanisme correspond à ce qu'on appelle « l'échange de brin donneur » et à lieu au niveau périplasmique (Remaut et al., 2006; Sauer et al., 2002b). Ainsi, chaque complexe chaperone/sous-unité subira un processus d'échange de brin donneur au niveau des domaines CTDs de l'us her avec le complexe précédemment recruté (Phan et al., 2011; Werneburg and Thanassi, 2018) (Figures 13 et 15).

Chaque sous-unité fimbriale, à l'exception de l'adhésine du système, présente une extension N-terminale (Nte) constituée de 10 à 20 résidus qui ne fait pas partie de son repliement. Elle est donc accessible pour se lier à une autre sous-unité. Cette extension comprend un ensemble de 4 résidus hydrophobes (P2, P3, P4 et P5) responsables de l'interaction entre les sous-unités. Dans le processus d'échange de brin donneur, les résidus P2 à P5 de l'extension Nte de la sous-unité entrante (n+1) se logent dans les poches P2 à P5 du sillon hydrophobe de la sous-unité déjà assemblée (n). Cette extension déloge ainsi le brin  $\beta$  G1 de la chaperone précédemment complexée avec la sous-unité fimbriale (n) (Figures 11 et 14). Cet échange est également qualifié de mécanisme « zip-in, zip-out » (Busch and Waksman, 2012; Remaut et al., 2006). Il est initié par l'insertion du résidu P5 de l'extension Nte dans la poche hydrophobe P5 restée libre de la sous-unité précédemment assemblée. Le brin correspondant à l'extension Nte de la sous-unité entrante (n+1) se positionne de façon antiparallèle au brin  $\beta$  F de la sous-unité déjà assemblée permettant ainsi un repliement immunoglobuline classique (Figure 14). De plus, l'extension Nte comprend des résidus plus petits que les résidus insérés par le brin  $\beta$  G1 de la chaperone. Les deux sous-unités étant liées par les résidus et les poches de P2 à P5, la poche hydrophobe P1 n'est plus occupée, ce qui permet la fermeture du sillon hydrophobe de la sous-unité via le rapprochement des brins  $\beta$  F1 et A1 (Busch and Waksman, 2012). Ce processus d'échange de brin donneur produit un complexe sous-unité/sous-unité correctement replié de faible énergie. L'interaction entre les sous-unités d'un fimbriae est d'ailleurs reconnue comme une des affinités de liaisons non-covalentes les plus fortes (Zavialov et al., 2005). Ces réseaux de repliements de type immunoglobuline liés de manière non-covalente permettent de constituer des fimbriae extrêmement stables.

### 3.4.3. Ordre d'assemblage des sous-unité fimbriales

L'ordre dans lequel les sous-unités fimbriales sont assemblées est d'une importance capitale pour assurer la présentation correcte de l'adhésine à la surface des bactéries. La régulation l'ordre d'assemblage dépend de plusieurs facteurs comprenant : (i) la sélection effectuée par l'usher, (ii) les affinités entre les complexes chaperone/sous-unité et les domaines de liaison de l'usher, (iii) le taux d'échange de brin donneur pour chaque interaction sous-unité/sous-unité et (iv) la concentration périplasmique en complexe chaperone/sous-unité (plus la concentration est élevée et plus le recrutement de ces complexes est rapide) (Werneburg and Thanassi, 2018).

L'assemblage commence par la mise en place de l'adhésine qui doit se trouver à la pointe du fimbriae, avec un complexe chaperone/adhésine qui possède une plus forte affinité pour le domaine NTD de l'usher que les autres complexes périplasmiques. Par exemple, pour le fimbriae de type 1, l'activation de l'usher a lieu lors de la liaison d'un complexe chaperone/adhésine (FimC-FimH) au domaine NTD de

l'usher. Le recrutement et l'assemblage correct des autres sous-unités se fait ensuite grâce aux différents niveaux d'affinité des complexes chaperone/sous-unité avec le domaine NTD de la protéine usher ; l'ordre de recrutement des complexes dépend de leur position dans la structure (Nishiyama and Glockshuber, 2010; Phan et al., 2011; Volkan et al., 2012).

Le processus de terminaison de l'assemblage du fimbriae n'est pas décrit pour tous les systèmes CU, mais il a pu être démontré pour le fimbriae de type P au moment où le complexe de terminaison PapD/PapH (chaperone/sous-unité) se lie à l'usher (Båga et al., 1987). La sous-unité de terminaison PapH se lie à la dernière sous-unité majeure PapA via le mécanisme d'échange de brin donneur. Une légère différence de structure de la sous-unité de terminaison PapH avec les autres sous-unités fimbriales fait qu'elle ne possède pas de poche P5 permettant la liaison à l'extension Nte d'une sous-unité suivante. La sous-unité de terminaison reste donc inaccessible à la liaison à n'importe quel sous-unité Pap et reste lié à son usher (Verger et al., 2006).

### 3.5. Fonctionnalité des fimbriae

La présence de plusieurs systèmes CU fonctionnels, mécaniquement assez similaires, chez un même pathogène est le reflet d'une grande diversité des spécificités de reconnaissance et d'attachement aux surfaces (Busch and Waksman, 2012). L'adhésine FimH du fimbriae de type 1 (Barnhart et al., 2003) reconnaît spécifiquement les protéines D-mannosylées des cellules épithéliales et permet ainsi la fixation des bactéries aux épithéliums, notamment urinaires (Korea et al., 2011). FimH est constituée de deux sous-domaines, un domaine C-terminal intégré dans la structure fimbriale et un domaine lectine N-terminal responsable de la liaison aux résidus mannose (Choudhury et al., 1999). D'autres adhésines de fimbriae CU interagissent avec d'autres substrats : l'adhésine PapG du fimbriae de type P se lie aux épitopes Gal $\alpha$ -1,4Gal $\beta$  présents sur les glycolipides à la surface des cellules de l'épithélium rénal et des érythrocytes, les adhésines des fimbriae du clade  $\gamma$ 2 se lient à des motifs présents au niveau des cellules de l'épithélium intestinal et celles du clade  $\gamma$ 3 à des motifs présents à la surface des neutrophiles et des érythrocytes (Busch and Waksman, 2012; Korea et al., 2011). L'expression séquentielle ou simultanée de plusieurs adhésines avec des spécificités différentes peut être associée à un processus physiopathologique dans les tissus de l'hôte. Cela a été proposé pour les souches d'*E. coli* uropathogène (UPEC) qui expriment séquentiellement des fimbriae de type 1 puis des fimbriae de type P afin de coloniser le tractus urinaire par voie ascendante (Snyder et al., 2005). Déterminer comment l'expression et la spécificité des systèmes fimbriaux affectent le tropisme tissulaire d'un pathogène est ainsi un élément essentiel dans la compréhension du processus de colonisation (Busch and Waksman, 2012).



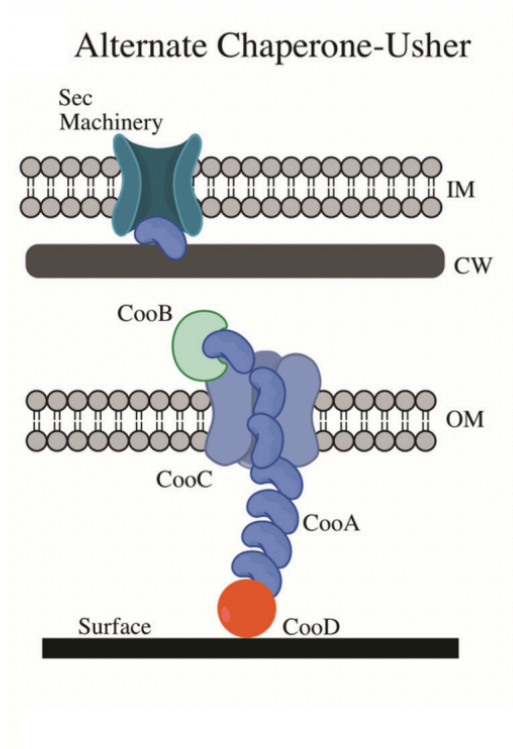


Figure 16 : **Représentation schématique de la voie d'assemblage alternative.** Dans le schéma, la membrane interne est représentée sur la partie haute, et la membrane externe sur la partie basse. La surface d'adhésion est représentée par un trait noir en bas du schéma. La voie d'assemblage CU est illustrée par le fimbriae de type 1 (*fim*), et la voie d'assemblage CU alternative est illustrée par le fimbriae CS1 (*CooABCD*) qui est l'antigène de surface 1 de *E. coli*. La protéine chaperone CooB est représenté en vert clair, l'usher transmembranaire CooC est en bleu grisé, la sous-unité majeure CooA est représenté par les éléments en forme de haricot bleu et l'adhésine CooD du système est représentée par le rond rouge (Adapté de Berne et *al.*, 2015).

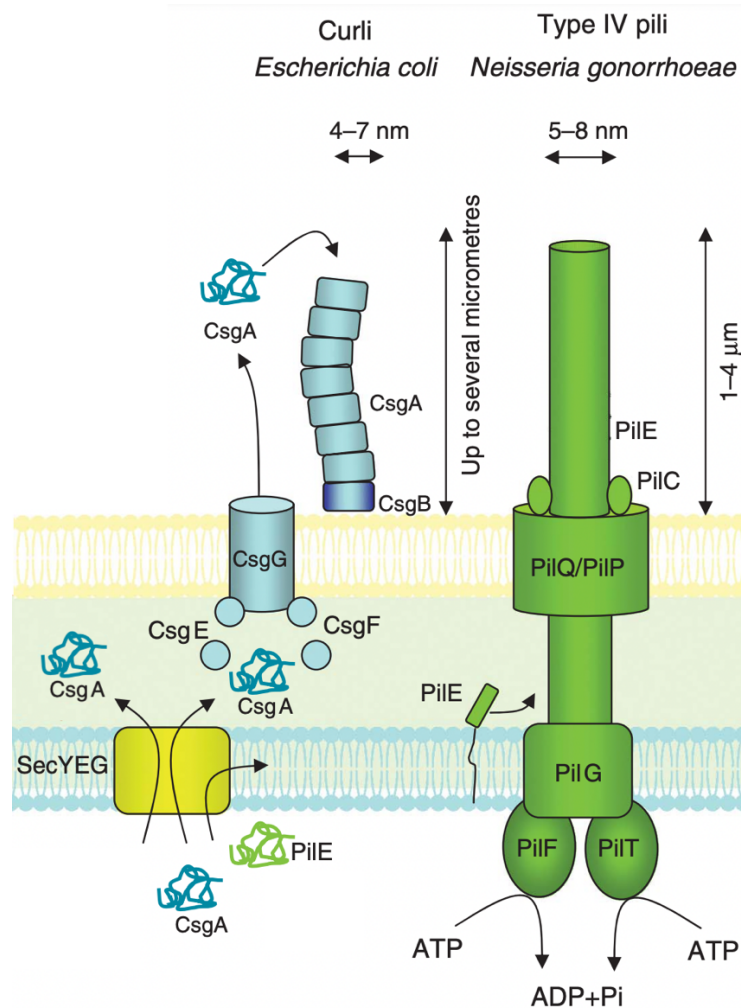


Figure 17 : **Représentation schématique des voies d'assemblage des curli et des fimbriae de type IV.** La voie d'assemblage des curli est représentée par le système Csg retrouvé chez *E. coli* et celle des fimbriae de type IV est représentée par le système Pil retrouvé chez *N. gonorrhoeae*. L'assemblage des curli fait intervenir la voie dite de « nucléation-précipitation ». La sous-unité majeure des curli CsgA (également appelée curline) est sécrétée dans le milieu extracellulaire à l'état soluble, non structurée, puis est convertie en fibre amyloïde en présence de la sous-unité mineure CsgB qui sert de nucléateur. Les deux protéines, CsgA et CsgB, sont sécrétées dans le périplasme par le système général de sécrétion Sec et à la surface bactérienne par de la protéine CsgG qui forme un pore à travers la membrane externe. Les protéines CsgE et CsgF jouent le rôle de chaperones et sont requises pour un assemblage efficace des curli à la surface. L'assemblage des fimbriae de type IV se fait grâce à l'énergie apportée par l'hydrolyse de l'ATP par les ATPases PilF et PilT, et nécessite un plus grand nombre de composants, à savoir : (i) des sous-unités majeures (PilE) et mineures (PilH, PilI, PilJ, PilK et PilL, non représentées), (ii) une ATPase (PilF) spécifique de l'assemblage du fimbriae, (iii) une prepilone peptidase (PilD, non représentée) qui a pour rôle de cliver le peptide signal N-terminal des sous-unités, (iv) une plateforme d'assemblage protéique (PilG) dans la membrane interne, (v) une protéine de membrane externe (PilP) qui recrute l'ATPase vers la membrane et (vi) une protéine de sécrétion (PilQ) ancrée dans la membrane externe nécessaire pour la mise en place de la structure fimbriale à la surface (Frozens et *al.*, 2008).

### 3.6. Les systèmes fimbriaux n'appartenant pas à la voie CU

Les fimbriae CU ont été largement décrits, mais d'autres familles de structures fimbriales existent et jouent un rôle dans un ensemble de fonctions telles que l'adhésion, la formation de biofilm ou les interactions entre microorganismes. En dehors de la famille CU, trois sous-groupes de structures fimbriales ont été décrits : les fimbriae de la voie d'assemblage alternatif des « chaperone-usher », les fimbriae de type IV et les curli de la voie de nucléation-précipitation extracellulaire (Berne et *al.*, 2015). La voie alternative des fimbriae chaperone-usher met en jeu une protéine « chaperone » et une protéine « usher » ; elle est classée dans la phylogénie des systèmes CU comme faisant partie du clade des fimbriae- $\alpha$  (Nuccio and Bäumlér, 2007). Malgré cela, les protéines de cette voie alternative ont peu, voire pas, de similarité avec les protéines des autres systèmes de la voie CU. Plusieurs antigènes de surface de souches d'*E. coli* enterotoxigéniques, comme l'antigène de surface 1 (CS1), sont inclus dans le clade des fimbriae- $\alpha$  et sont impliqués dans la colonisation intestinale et la formation de biofilm sur du matériel médical (Liaqat and Sakellaris, 2012; Svennerholm et *al.*, 1990). L'antigène de surface 1 présente une structure classique de ce groupe de fimbriae, et comme pour les fimbriae CU, les protéines sont transloquées dans le périplasma via le système général Sec. Le système CS1 est le modèle le plus employé pour représenter cette famille de fimbriae (Figure 16). Ces fimbriae sont ainsi composés de quatre éléments : une protéine de sous-unité majeure CooA (15,2 kDa), une protéine CooB qui joue un rôle de chaperone en limitant l'agrégation de CooA dans le périplasma, une protéine CooC (94 kDa) intégrée dans la membrane externe semblable à un usher, et une protéine de sous-unité mineure CooD (38 kDa) qui joue potentiellement le rôle de la pointe du système (Perez-Casal et *al.*, 1990; Sakellaris and Scott, 1998; Sakellaris et *al.*, 1996; Voegelé et *al.*, 1997) (Figure 16). Tout comme la voie CU, les sous-unités de la voie alternative semblent suivre le mécanisme d'échange de brin donneur (Berne et *al.*, 2015).

Les fimbriae de type IV sont des filaments longs et fins de 6 à 8 nm de diamètre et de 1 à 4  $\mu$ m de longueur. Ils sont constitués de sous-unités assemblées chacune en tube protéique de 15-20 kDa (Figure 17). Tout comme les fimbriae de la voie CU et de la voie alternative, les sous-unités protéiques des fimbriae de type IV sont transportées dans le périplasma par le système général de sécrétion. A la différence des systèmes décrits précédemment, le processus d'assemblage des fimbriae de type IV à la surface de la cellule se fait grâce à l'énergie apportée par l'hydrolyse de l'ATP et il nécessite un plus grand nombre de composants, à savoir : (i) des sous-unités majeures et mineures, (ii) une ATPase spécifique de l'assemblage du fimbriae, (iii) une prépiline peptidase qui a pour rôle de cliver le peptide signal N-terminal des sous-unités, (iv) une plateforme d'assemblage protéique, (v) une protéine de membrane externe qui recrute l'ATPase vers la membrane et (vi) une protéine de sécrétion ancrée dans la membrane externe nécessaire pour la mise en place de la structure fimbriale à la surface (Berne

et *al.*, 2015; Frozens et *al.*, 2008). Une caractéristique de ces fimbriae est que les sous-unités fimbriales sont d'abord synthétisées sous forme de précurseurs, appelée prépilines, qui possèdent un peptide signal hydrophile qui est clivé par la prepiline peptidase. Les fimbriae de type IV sont divisés en deux sous-groupes, le type IVa qui possède une prepiline avec un peptide signal court (5 à 10 acides aminés) et le type IVb qui possède une prepiline avec un peptide signal long (15 à 30 acides aminés) (Berne et *al.*, 2015). En plus de leur rôle dans l'adhésion et la formation de biofilm, les fimbriae de type IV ont des rôles multiples, notamment dans la motilité bactérienne de type twitching, l'auto-agrégation, l'adhésion et l'acquisition d'ADN (Giltner et *al.*, 2012).

Les curli sont de fins fimbriae de 4 à 7 nm de diamètre et de longueur variable. Ils sont présents dans une large variété d'espèces bactériennes et très abondants notamment chez *Escherichia* et *Salmonella* (Chapman et *al.*, 2002; Frozens et *al.*, 2008). Ces curli sont mis en place par le biais d'un processus de régulation très complexe. Ainsi, les souches d'*E. coli* possédant les gènes codant des unités structurales de curli n'ont pas toutes la capacité de les assembler (Proft and Baker, 2009). Leur assemblage fait intervenir la voie dite de « nucléation-précipitation ». La sous-unité majeure des curli est le monomère CsgA, également appelée curline. CsgA est sécrétée dans le milieu extracellulaire à l'état soluble, non structurée, puis est convertie en fibre amyloïde en présence de la sous-unité mineure CsgB qui sert de nucléateur (Frozens et *al.*, 2008) (Figure 17). Les deux protéines de ce complexe (CsgA et CsgB) sont sécrétées à la surface bactérienne par le biais de la protéine CsgG qui forme un pore à travers la membrane externe. Deux autres protéines périplasmiques, CsgE et CsgF, jouent le rôle de chaperones et sont requises pour un assemblage efficace des curli à la surface (Figure 17). Les curli sont associées aux processus d'adhésion initiale et de formation de biofilm chez *E. coli* et *Salmonella enteritidis* (Austin et *al.*, 1998; Bokranz et *al.*, 2005; Cookson et *al.*, 2002), ainsi que dans la formation de biofilm multi-espèces grâce à leurs capacités d'adhésion aux fibres protéiques (Zhou et *al.*, 2012). De plus, les curli ont été décrit comme capable de se lier à la fibronectine de la matrice extracellulaire, ce qui confère aux bactéries un avantage dans le processus de colonisation de l'hôte (Proft and Baker, 2009).

## 4. Les déterminants de la résistance : les pompes à efflux

### 4.1. Stress environnementaux et mécanismes de résistance

Les populations de microorganismes sont exposées, au gré des différentes niches qu'elles colonisent, à de rapides changements de conditions environnementales qui se révèlent parfois défavorables pour leur croissance et leur survie. Les entérobactéries sont notamment sujettes à ces changements puisque qu'elles peuvent passer de niches environnementales au tractus digestif des mammifères. Elles sont alors confrontées à un pH très bas (estomac) et à une forte osmolarité, mais également aux défenses

immunitaires et à des facteurs antimicrobiens présents au niveau intestinal. La capacité des microorganismes à s'adapter rapidement à des environnements changeants est donc essentielle pour leur implantation chez un organisme hôte. Ces changements de conditions environnementales induisent une réponse au stress qui consiste en des modifications spécifiques de l'expression de gènes cibles. Ces réponses peuvent être générales, ou spécifiques du stress rencontré. La plupart des stress environnementaux provoque une réponse générale contrôlée par un régulateur central, le facteur sigma RpoS ou  $\sigma^S$  décrit chez *E. coli* (Giuliodori et al., 2007). Ce régulateur est responsable de la spécificité de reconnaissance des promoteurs de gènes impliqués dans les processus adaptatifs, ce qui permet de limiter l'affinité de l'ARN polymérase pour des gènes codant des fonctions non essentielles. Le facteur sigma RpoS va par exemple conduire à l'induction des gènes *otsA* et *ostB* impliqués dans la synthèse de tréhalose lors d'un stress thermique rencontré chez *E. coli*. Les tréhaloses sont en effet des molécules connues comme osmoprotectrices et peuvent permettre à la bactérie de survivre face à un choc thermique (Hengge-Aronis et al., 1991). RpoS et d'autres régulateurs de la réponse au stress ont ainsi été décrits comme éléments essentiels pour la survie face aux défenses de l'hôte et d'autres conditions de stress (exposition au UV, variation de pH, diminution de concentration en nutriment) (Hengge-Aronis, 2000; Storz and Hengge-Aronis, 2000). De façon générale, les mécanismes mis en place par la bactérie lors de stress conduit à la mise en place d'une réponse processus permettant de protéger les processus vitaux, de restaurer/maintenir l'homéostasie cellulaire et d'accroître la résistance à des composés toxiques pour la cellule (Aertsen and Michiels, 2004). Pour limiter les coûts énergétiques, la stratégie majoritairement adoptée par les microorganismes en présence d'un stress environnemental a pour but de favoriser la survie et la persistance plutôt que la croissance et la prolifération des bactéries (Ferenci and Spira, 2007; King et al., 2004). Cependant, le facteur sigma RpoS est également décrit comme contribuant à l'augmentation de la virulence de certains pathogènes en régulant directement l'expression de gènes de virulence (Dong and Schellhorn, 2010; Hengge-Aronis, 2000).

Parmi les réponses aux stress des bactéries, celle en réponse aux agents antimicrobiens est la plus décrite dans la littérature en raison de son importance au niveau clinique. Face à des molécules antimicrobiennes telles que les antibiotiques, les bactéries activent l'expression de gènes spécifiques impliqués dans la tolérance ou la résistance à ces composés toxiques ; l'ensemble de ces gènes est appelé « résistome ». En raison de la pression de sélection observée en milieu clinique, une augmentation rapide de l'acquisition de gènes de résistances aux antibiotiques a ainsi été observée chez des souches d'entérobactéries, conduisant à l'émergence de souches multirésistantes, ce qui constitue un problème majeur de santé publique (Magiorakos et al., 2012). C'est notamment le cas de l'espèce *K. pneumoniae* qui représente un des agents les plus préoccupants, retrouvée sous la forme

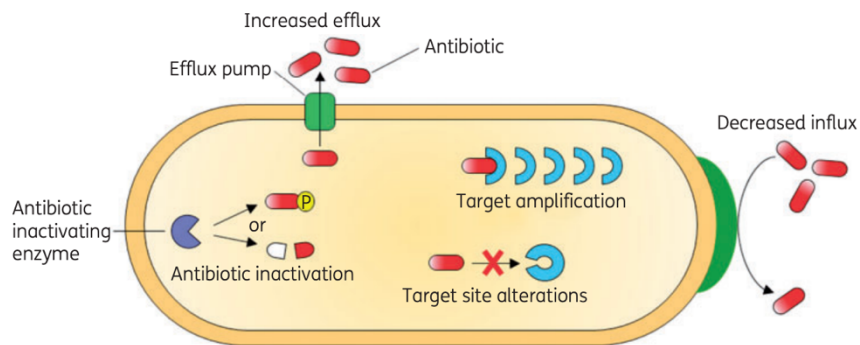


Figure 18 : **Représentation schématique des mécanismes de résistance aux antibiotiques.** Les phénomènes de résistance aux antibiotiques mettent en jeu différents mécanismes, tels que (i) la modification / le changement de la structure de la cible (demi-cercle bleu clair), (ii) une surproduction de la molécule cible pour dépasser la capacité d'action de l'antibiotique et ne pas interrompre le fonctionnement cellulaire, (iii) une dégradation des antibiotiques par des enzymes spécifiques, (iv) une limitation de l'entrée des antibiotiques en modifiant la perméabilité membranaire et (v) une excrétion à l'extérieur de la cellule des antibiotiques par des systèmes d'efflux (Alav et *al.*, 2018).

de portage sain mais également dans des situations pathologiques. Elle a d'ailleurs été classée, avec d'autres agents pathogènes porteurs de résistances, comme un organisme « ESKAPE » (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*) désigné par des organismes de surveillance (des hôpitaux et l'organisation « Infectious Diseases Society of America ») comme « à suivre » du fait de leur acquisition rapide de résistance (Pendleton et al., 2013). D'après le réseau de surveillance européen sur les résistances antimicrobiennes, *K. pneumoniae* a développé des résistances vis-à-vis des molécules antibiotiques de quatre classes principales : céphalosporines de troisième génération, carbapénèmes, aminosides et fluoroquinolones (Navon-Venezia et al., 2017). Tous les pays n'ayant pas les mêmes souches endémiques, les résistances varient considérablement en fonction des régions, mais continuent d'augmenter de façon constante. De plus, *K. pneumoniae* montre une supériorité en termes de résistance à toutes les classes d'antibiotiques comparativement à *E. coli*, ce qui met en lumière le rôle majeur joué par cette espèce dans l'émergence et le transfert des résistances aux antibiotiques intra et inter-espèces.

La résistance aux composés antibiotiques se met en place selon quatre mécanismes fondamentaux (Figure 18). Un premier mécanisme consiste à une modification de la structure de la cible de l'antibiotique, ce qui réduit l'affinité et donc l'activité de l'antibiotique sur cette dernière. Ce mécanisme est par exemple mis en place par *S. aureus* pour la résistance à la méticilline (antibiotique du genre des  $\beta$ -lactamines et de la famille des pénicillines). Dans la cellule bactérienne, la méticilline se fixe sur des protéines de liaison à la pénicilline dites « penicilin-binding protein » (PBP), impliquées dans les processus de synthèse de la membrane, et les inactive. Les clones de *S. aureus* résistants à la méticilline produisent des PBP de poids moléculaire plus élevé qui possèdent une affinité plus faible pour l'antibiotique, empêchant ainsi sa liaison (Hartman and Tomasz, 1984). Un second mécanisme consiste à surexprimer le gène codant la cible de l'antibiotique, afin de la produire en grande quantité pour dépasser la capacité d'action de l'antibiotique. Chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, un des mécanismes de résistance au triméthoprime consiste à la surproduction de sa cible, la dihydrofolate réductase, qui joue un rôle dans la voie de synthèse de l'ADN (Burchall et al., 1982; Flensburg and Sköld, 1987; Then, 1982). Le troisième mécanisme est une action directe sur les antibiotiques en les inactivant par voie enzymatique. Ce mécanisme de dégradation enzymatique est l'une des causes de résistance les plus communes pour la classe des  $\beta$ -lactamines. Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse du cycle  $\beta$ -lactame de cette famille d'antibiotique nécessaire à l'activité antimicrobienne de la molécule (Fisher et al., 1980). Enfin, le dernier mécanisme de résistance consiste à limiter l'entrée des composés antimicrobiens dans la cellule en modifiant la perméabilité membranaire. La diminution de l'absorption passive (via les porines) ou l'augmentation de l'excrétion active des

antibiotiques sont largement étudiées car il s'agit des principaux contributeurs de ce phénotype bactérien de multirésistance (Aleksun and Levy, 2007; Davin-Regli et al., 2008; James et al., 2009; Li and Nikaido, 2009; Martinez, 2009; Nikaido, 2009; Nikaido and Pagès, 2012; Piddock, 2006; Poole, 2007). Ces processus se mettent en place via l'activation de divers types de transporteurs membranaires qui permettent l'excrétion des antibiotiques. C'est notamment le cas des pompes à efflux qui sont actuellement reconnues comme le mécanisme majeur de résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram-négatif (Courvalin, 2008; Davies and Davies, 2010; Sharma et al., 2019). Une pression antibiotique peut avoir une influence sur l'abondance, la modulation et la diffusion d'élément transposable pouvant comprendre des pompes à efflux, conduisant à des événements génétiques tels que des mutations rendant les pompes multirésistantes ou abolissant l'expression de répresseurs transcriptionnels de ces dernières (Martínez and Baquero, 2014; Normark and Normark, 2002).

#### 4.2. Généralités sur les pompes à efflux

La paroi des bactéries à Gram-négatif forme une barrière de protection face aux agressions extérieures, qu'elles soient physiques, chimiques ou biologiques. Le contrôle de la perméabilité et de l'intégrité de cette barrière est essentiel à la survie de la bactérie. Parmi les protéines de la bicouche phospholipidiques, on retrouve des protéines transmembranaires formant des pores ou canaux qui permettent la circulation de diverses classes de molécules. Cette circulation peut être passive, notamment via les porines, ou active via des systèmes appelés pompes à efflux. Ces systèmes d'efflux participent à l'homéostasie cellulaire : un de leur rôle majeur est de limiter l'accumulation de substrats potentiellement toxiques pour la bactérie (sels biliaires, métaux lourds, solvants organiques antiseptiques, antibiotiques, ...). Ces transporteurs sont également capables d'intervenir dans la sécrétion et le transport de métabolites endogènes ou encore de produits cellulaires (toxines, bactériocines, facteurs de virulence, ...) (Auda et al., 2020). La plupart des pompes à efflux ont été décrites initialement pour leur rôle dans l'excrétion de molécules en dehors de la cellule, expliquant l'emploi du terme « efflux ». Cependant, leur implication dans une multiplicité de fonctions physiologiques chez les bactéries a révélé que certaines de ces pompes sont parfois capable de réaliser le transport de substrat vers l'intérieur de la cellule. C'est par exemple le cas du transporteur BtuCD chez *E. coli* qui permet l'import de vitamine B12 dans la bactérie (Borths et al., 2005).

Les premiers systèmes d'efflux décrits dans la littérature sont des transporteurs présents chez *E. coli* qui confèrent une résistance spécifique à la tétracycline (Levy and McMurry, 1978; McMurry and Levy, 1978). En effet, la prise en charge d'un antibiotique par une pompe à efflux permet de diminuer sa concentration intracellulaire, et donc à la bactérie de survivre même en présence d'une forte concentration en antibiotique dans son environnement. Les pompes à efflux ont été initialement



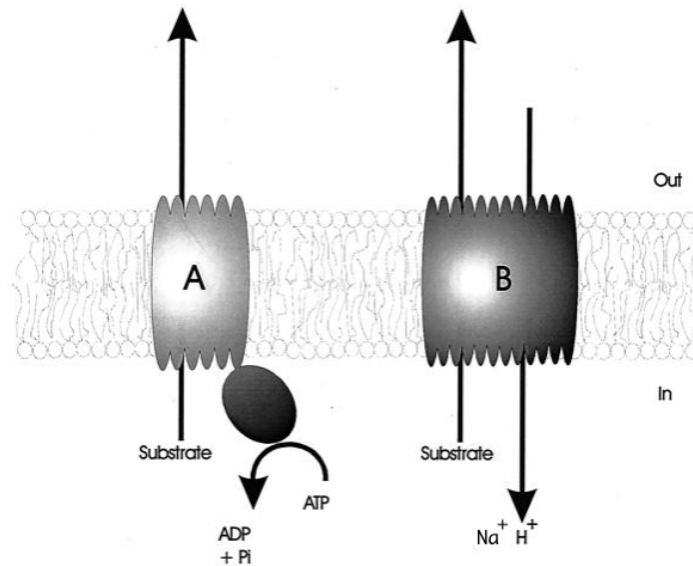


Figure 19 : **Représentation schématique des sources d'énergie des pompes à efflux.** La figure représente deux transporteurs (A et B) utilisant deux sources d'énergie pour le transport de substrat à travers la membrane. Les transporteurs de type ABC (A) utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter leur substrat à travers la membrane cellulaire ; il s'agit d'un transport actif. Les transporteurs utilisant un gradient ionique (protons, ions sodium) comme source d'énergie (B) pour le transport d'un substrat ; il s'agit d'un transport secondaire. Ce type de transport peut être un symport (transport des ions dans le même sens que celui du substrat) ou un antiport (transport des ions dans le sens opposé à celui du substrat) (Putman et al., 2000).

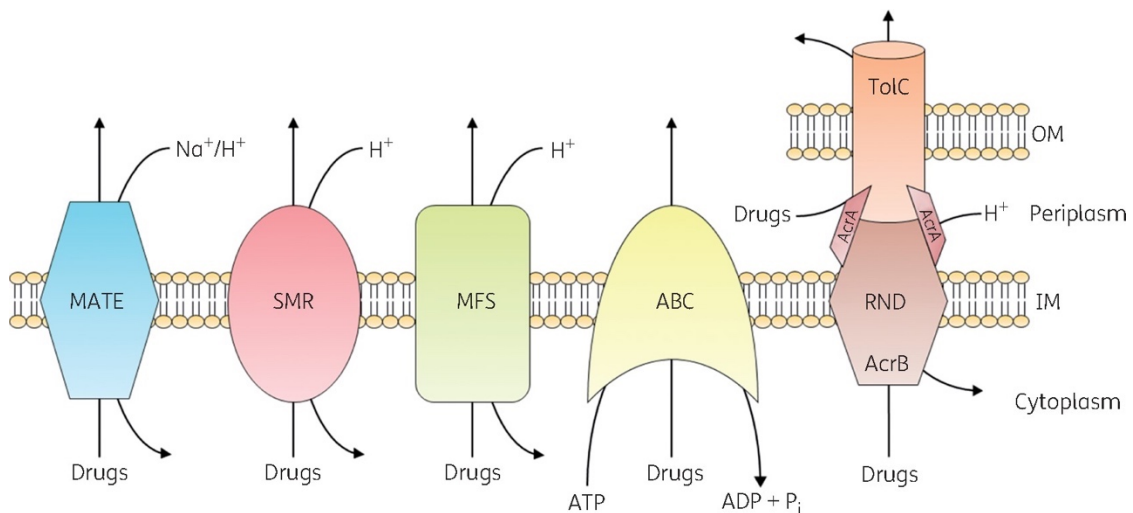


Figure 20 : **Représentation des cinq superfamilles de pompes à efflux.** La figure représente les familles de pompes à efflux présentes chez les bactéries et leur mécanisme de couplage énergétique. Les pompes à efflux permettent généralement le transport de substrats depuis le cytosol vers l'environnement extracellulaire. Sont représentées : la famille des transporteurs MATE (Multidrug And Toxic-compound Extrusion) couplés à un gradient de protons/d'ions, la famille des transporteurs SMR (Small Multidrug Resistance) couplés à un gradient de protons, la famille des transporteurs MFS (Major Facilitator Superfamily) couplés à un gradient de protons et la famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) couplés à une hydrolyse d'ATP. Ces différents transporteurs sont ancrés dans la membrane interne (IM) des bactéries. Les pompes à efflux de la famille RND (Resistance-Nodulation-cell Division) sont couplées à un gradient de protons et sont organisées en systèmes tripartites traversant à la fois la membrane interne, le périplasm et la membrane externe (OM) de la cellule (Alav et al., 2018)

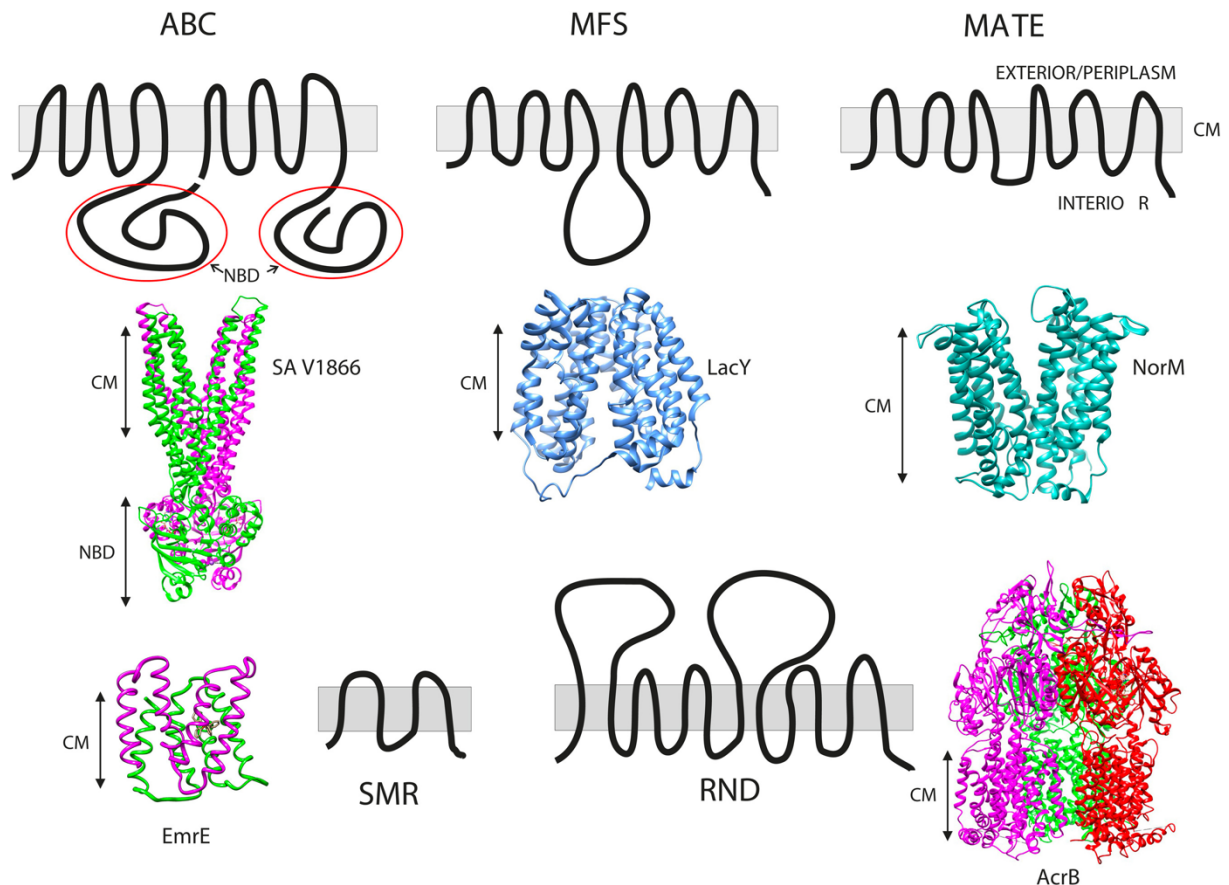


Figure 21 : **Représentation schématique de la structure des 5 familles de pompes à efflux.** L'organisation transmembranaire au sein de la membrane interne (CM : membrane cytoplasmique) et la structure des transporteurs (représentation en ruban) sont présentées pour chacune des 5 familles de pompe à efflux. Le transporteur de la famille ABC (ATP Binding Cassette), présenté ici en dimère, comprend 6 segments hydrophobes ancrés dans la membrane interne et un domaine nucléique hydrophile de liaison à l'ATP (NBD : Nucleic Binding Domain). Le système SAV1866 de *S. aureus* est pris comme exemple pour représenter la structure tridimensionnelle (Dawson et Locher, 2006). Le transporteur de la famille MFS (Major Facilitator Superfamily) comprend 12 segments hydrophobes ancrés dans la membrane interne. Le transporteur MFS LacY (lactose perméase) d'*E. coli* est pris comme exemple pour représenter la structure tridimensionnelle (Abramson et *al.*, 2003). Le transporteur de la famille MATE (Multidrug And Toxic-compound Extrusion) comprend 12 segments hydrophobes ancrés dans la membrane interne. Le transporteur MATE NorM de *Vibrio cholerae* est pris comme exemple pour représenter la structure tridimensionnelle (He et *al.*, 2010). Le transporteur de la famille SMR (Small Multidrug Resistance) comprend 4 segments hydrophobes ancrés dans la membrane interne. Le transporteur SMR EmrE d'*E. coli* organisé en homodimère est pris comme exemple pour représenter la structure tridimensionnelle (Chen et *al.*, 2007). Le transporteur de la famille RND (Resistance-Nodulation-cell Division) comprend 12 segments hydrophobes ancrés dans la membrane interne et deux boucles périplasmiques. Le transporteur RND AcrB d'*E. coli* organisé en homotrimer est pris comme exemple pour représenter la structure tridimensionnelle (Murakami et *al.*, 2002). La membrane interne est représentée en gris pour les diagrammes schématiques et par des flèches sur les représentations en ruban (Schindler and Kaatz, 2016).

considérées comme des transporteurs spécifiques d'un seul type de substrat. Mais, au fil du temps, de nombreux autres transporteurs ont été décrits comme capables de prendre en charge des composés de structures variées (Li and Nikaido, 2004, 2009). Certaines pompes à efflux sont ainsi capables de transporter des antibiotiques de différentes classes, générant ainsi des phénomènes de multirésistances (Poole, 2004).

La topologie des pompes à efflux est variable selon les bactéries. Les bactéries à Gram-positif possèdent principalement des pompes à efflux localisées dans la membrane cytoplasmique et permettant d'excréter les molécules dans l'espace contigu au peptidoglycane (Fernández and Hancock, 2012). Chez les bactéries à Gram-négatif, la compartimentation de la paroi fait que la plupart des pompes à efflux s'étendent de la membrane interne à la membrane externe traversant le périplasme. Ces pompes sont dites tripartites car elles sont constituées de trois sous-unités protéiques. Elles sont composées d'une protéine de transport située au niveau de la membrane interne et d'une protéine d'excrétion localisée dans la membrane externe qui sont reliées entre elles par l'intermédiaire d'une protéine de liaison, formant un canal transmembranaire dans le périplasme (Aires, 2011; Auda et al., 2020). Ces pompes à efflux sont divisées en deux groupes selon la source d'énergie nécessaire pour le transport des substrats : les transporteurs ABC et les transporteurs secondaires. Les transporteurs ABC utilisent l'énergie apportée par l'hydrolyse d'ATP, alors que les transporteurs secondaires exportent les substrats grâce à un gradient de protons ou d'ions sodium ; la dissipation de ce gradient électrochimique est alors appelée la « force proton motrice » (Figure 19). La classification de ces pompes a été établie à partir de leur structure second-tertiaire qui permet de définir 5 familles. Quatre d'entre elles utilisent de la force proton motrice (Major Facilitator Superfamily (MFS), Multidrug And Toxic-compound Extrusion (MATE), Small Multidrug Resistance (SMR) et Resistance-Nodulation-cell Division (RND)). La cinquième famille correspond aux transporteurs ABC (ATP Binding Cassette ou Cassette de liaison à l'ATP) qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie. La plupart des espèces bactériennes expriment plusieurs systèmes d'efflux, pouvant appartenir à ces différentes familles (Saier and Paulsen, 2001) (Figures 20 et 21).

### 4.3. Les familles de pompes à efflux

#### 4.3.1. La famille ATP Binding Cassette (ABC)

Les transporteurs de la famille ABC sont la seule famille de pompe à assurer l'import et l'export de leur substrat en utilisant l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie (Dawson and Locher, 2006). Cette famille de transporteurs est couramment décrite au sein du monde bactérien mais elle est également répandue chez les eucaryotes, avec notamment une implication dans les processus de résistance aux anticancéreux par les cellules tumorales (Gottesman et al., 1996; Umsumarng et al., 2013). Les

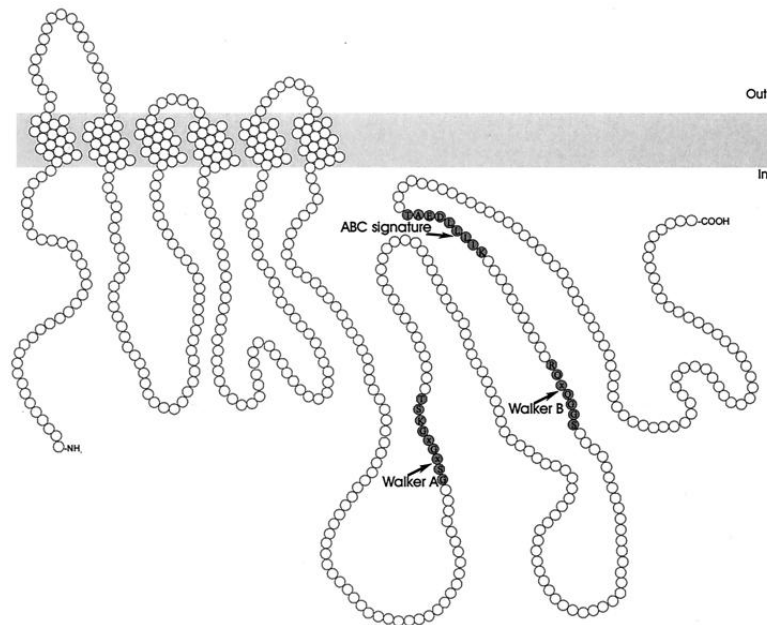


Figure 22 : **Modèle de la structure des pompes à efflux de la superfamille ABC.** Le transporteur représenté ici possède six hélices transmembranaires et un domaine C-terminal intracellulaire contenant les motifs Walker A et B et la séquence signature ABC (zones grisées). La membrane interne est représentée en gris avec le périplasm en haut (Out) et le cytoplasme en bas (In) (Putman et *al.*, 2000).

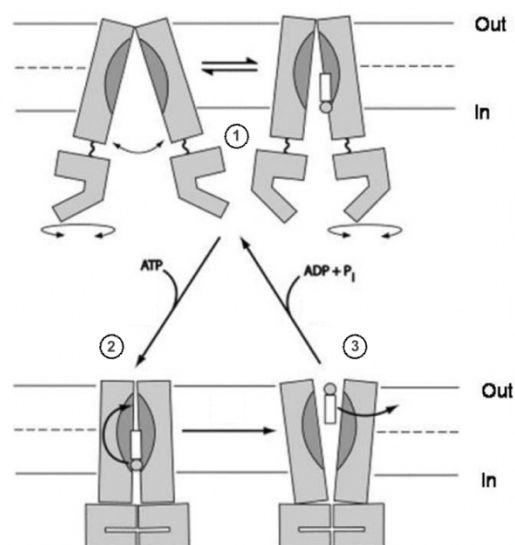


Figure 23 : **Représentation du mécanisme de transport d'une pompe de la famille ABC.** La figure représente les 3 étapes du mécanisme de transport de la pompe MsbA de *V. cholerae*. Ce mécanisme en trois étapes commence par un état ouvert vers l'intérieur de la cellule où le substrat peut se lier à la pompe et entraîner la rotation des domaines de liaison aux nucléotides et leur liaison à l'ATP (1). Ensuite la pompe se retrouve dans un état fermé pendant lequel le substrat est dirigé vers la partie externe de la pompe (2). La pompe s'oriente alors vers un état ouvert vers le milieu extérieur, grâce à l'hydrolyse de l'ATP, permettant la libération du substrat (4) puis un retour du système dans un état de repos. La pompe, représentée en gris et la liaison au substrat en gris foncé, se situe au sein de la membrane interne (représentée avec les traits gris, avec le périplasm en haut (Out) et le cytoplasme en bas (In)) (Langton et *al.*, 2005)

transporteurs ABC présents chez les bactéries sont capables d'effectuer une large gamme de fonction de transport. Les composés transportés par ces systèmes comprennent des sucres, des acides aminés, des peptides, des ions sulfates et phosphates, des cations métalliques, des chélateurs de fer, des polyamines et des vitamines (Neidhardt, 1996). Certains, appelée transporteurs ABC-2, peuvent également exporter des molécules antibiotiques et des polysaccharides (Nikaido and Hall, 1998). Parmi les plus caractérisés, on retrouve le système MalKFG responsable de l'import de maltose chez *E. coli* (Kühnau et al., 1991) et le système HisPMQ responsable de l'import d'histidine chez *Salmonella typhimurium* (Kustu and Ames, 1973).

Les transporteurs ABC sont des protéines d'environ 600 acides aminés et leur structure est composée de deux domaines. Le domaine hydrophobe, ancré dans la membrane interne par l'intermédiaire de 6 segments, est responsable de la reconnaissance et de la liaison du (ou des) substrat(s) (Figure 21). Le domaine hydrophile intracellulaire est responsable de la liaison et l'hydrolyse de l'ATP (Dawson and Locher, 2006; Johnson and Chen, 2017). Ce domaine comprend des régions conservées dont les motifs « Walker A » et « Walker B » responsables de la liaison à l'ATP et le motif « signature ABC », un motif conservé pouvant être identifié dans les domaines de liaison aux nucléotides de tous les transporteurs de la famille ABC (Figure 22).

Ces protéines sont généralement assemblées sous forme de dimères (Borges-Walmsley et al., 2003; Putman et al., 2000), et peuvent être divisées en deux groupes : homodimères et hétérodimères. Les systèmes ABC appartenant au groupe des homodimères sont un complexe de deux protéines identiques avec une répétition des mêmes domaines intracellulaire de liaison aux nucléotides. Les systèmes ABC appartenant au groupe des hétérodimères sont composés de deux protéines homologues mais non identiques et comprennent donc deux domaines intracellulaires différents de liaison aux nucléotides, dont l'un possède un site de liaison dégénéré ne permettant pas l'hydrolyse de l'ATP. Dans cette situation, la molécule d'ATP se positionne entre les deux domaines de liaison aux nucléotides et favorise leur contact (Hürlimann et al., 2017). Le mécanisme de circulation au travers de la bicouche lipidique des transporteurs ABC a pu être décrit grâce à des observations des structures cristallisées du transporteur MsbA (Mi et al., 2017). Ce mécanisme en trois étapes a lieu via une alternance de la conformation protéique sous trois états (Figure 23), passant (i) d'un état ouvert vers l'intérieur de la cellule où le substrat peut se lier à la pompe et entraîner la rotation des domaines de liaison aux nucléotides et leur liaison à l'ATP, à (ii) un état fermé où le substrat est dirigé vers la partie externe de la pompe puis (iii) à un état ouvert vers le milieu extérieur suite à l'hydrolyse de l'ATP par la pompe (Du et al., 2018). Ainsi, le transporteur MsbA utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour excréter le précurseur du lipopolysaccharide, le lipide A, à travers la membrane interne et permettre son excréation à la membrane externe en étant pris en charge par une ou plusieurs autres protéines

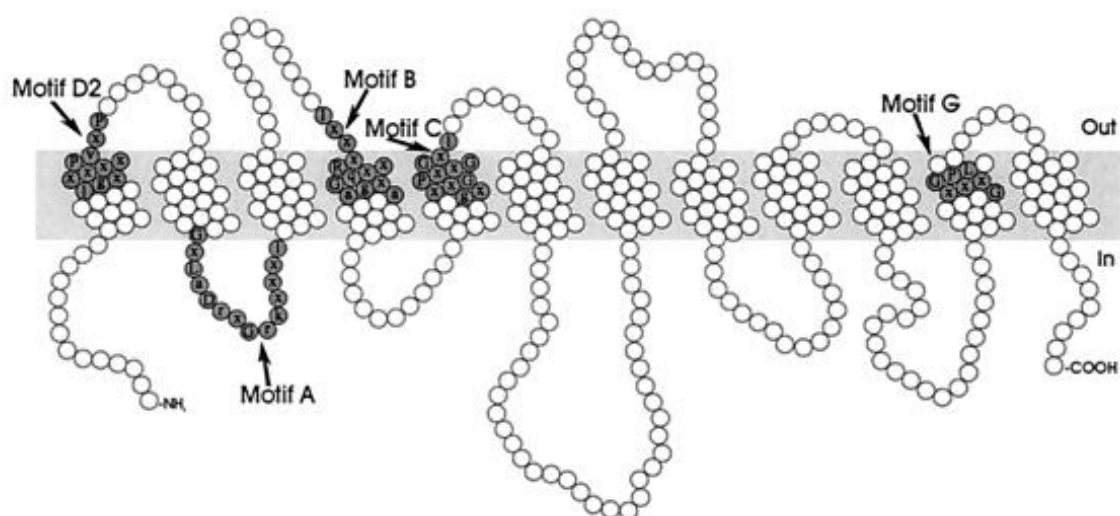


Figure 24 : **Modèle de la structure des pompes à efflux de la famille MFS.** La figure représente un exemple de pompe à efflux de la famille MFS possédant 12 segments transmembranaires. Les résidus représentés en gris correspondent aux motifs des séquences conservées. Ces séquences conservées sont retrouvées dans les séquences protéiques de toutes les protéines de transport MFS, et elles sont utilisées pour confirmer leur appartenance à cette famille. La membrane interne est représentée en gris avec le périplasm en haut (Out) et le cytoplasme en bas (In) (Putman et *al.*, 2000)

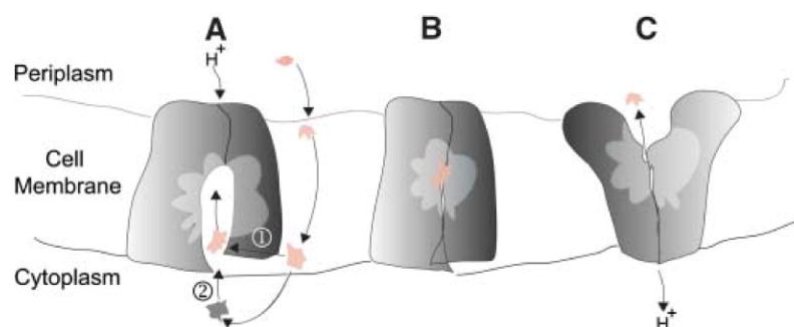


Figure 25 : **Représentation du mécanisme de transport d'une pompe de la famille MFS.** La figure représente le transport d'un substrat par la pompe EmrD d'*E. coli*. Le substrat (forme rose) présent dans le périplasm pénètre dans la cellule en diffusant au travers de membrane interne de manière passive. Le substrat rentrer dans la cavité interne du transporteur soit par le feuillet de la membrane interne (1), soit par le cytoplasme (2), puis se lie à la poche de liaison hydrophobe ce qui induit un changement conformationnel du transporteur (B). Le substrat est transporté selon un modèle d'accès alternatif couplé à un transfert d'H<sup>+</sup> dans la direction opposée. (C) Le transporteur passe dans un état ouvert vers l'extérieur (périplasm) et permet la libération du substrat (Yin et *al.*, 2006)

(les protéines Lpt dans le cas du transporteur MsbA) (Cuthbertson et *al.*, 2010; Pérez-Burgos and Søggaard-Andersen, 2020).

#### 4.3.2. La famille Major Facilitator Superfamily (MFS)

La famille des transporteurs MFS est celle qui comprend le plus grand nombre de pompes à efflux actuellement connues. Elle est présente dans tous les domaines de la vie et constitue la famille des transporteurs les plus diversifiés. Ces transporteurs sont constitués d'une seule sous-unité protéique de 400 à 600 acides aminés et sont divisés en 2 sous-familles en fonction de leur nombre de segments transmembranaires : 12 ou 14 (Radestock and Forrest, 2011) (Figures 24 et 21). La plupart des transporteurs de la famille des MFS fonctionnent comme des unités monomériques uniques organisées en deux domaines constitués de 6 ou 7 segments transmembranaires. Les extrémités N-terminale et C-terminale des transporteurs MFS sont toutes les deux retrouvées au niveau du cytoplasme. Une étude récente par cristallographie a mis en évidence la structure homodimérique du transporteur de nitrate NRT1.1 de la famille MFS chez la plante *Arabidopsis* (Sun et *al.*, 2014). Chez les bactéries à Gram-négatif, les transporteurs MFS présents dans la membrane interne peuvent former un complexe tripartite en s'associant avec deux autres protéines afin d'excréter les substrats à l'extérieur des cellules (Federici et *al.*, 2005). C'est le cas du transporteur CmlA décrit chez *P. aeruginosa* pour son rôle dans l'excrétion du chloramphénicol ou de la pompe à efflux QepA identifiée chez *E. coli* capable d'exporter certaines fluoroquinolones (Bissonnette et *al.*, 1991; Yamane et *al.*, 2007).

Les transporteurs MFS impliqués dans l'efflux de molécules antimicrobiennes sont couplés à un mouvement de protons/d'ions dans la direction opposée à celle du substrat (Du et *al.*, 2018). Le mécanisme de transport via les systèmes MFS est décrit comme résultant de changements de conformation des domaines protéiques, de façon similaire à ce qui a été décrit précédemment pour les systèmes ABC. Les données de cristallographie du système EmrD présente chez *E. coli* (Yin et *al.*, 2006) ont permis de décrire le processus de transport (Figure 25). Sous sa première conformation, le transporteur est dans un état ouvert vers le cytoplasme. Le substrat peut se lier au niveau de la poche hydrophobe située au sein de la cavité interne du transporteur, ce qui induit un changement de conformation. Cette transition conformationnelle fait passer le transporteur dans un état ouvert vers le périplasme, et permet alors la libération du substrat (Du et *al.*, 2018; Yin et *al.*, 2006).

#### 4.3.3. La famille Multidrug And Toxic-compound Extrusion (MATE)

Les transporteurs de la famille MATE, représentant un groupe assez hétérogène, sont classés en trois sous familles en fonction de leur similarité de séquence en acide aminés : NorM, DinF et les systèmes

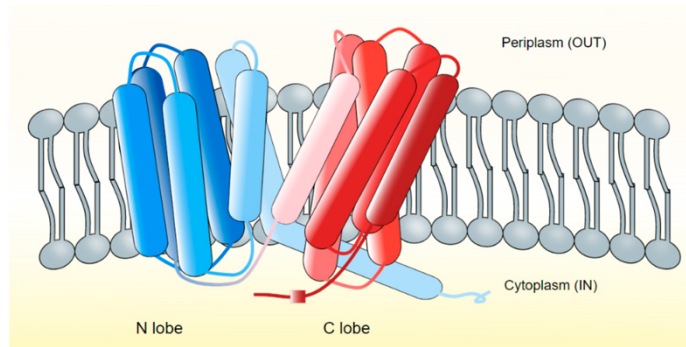


Figure 26 : **Représentation de la structure des pompes à efflux de la famille MATE.** Les transporteurs MATE sont généralement composés de 12 segments transmembranaires dans la membrane interne qui sont repliés en deux lobes distincts de 6 segments : le lobe N est composé des segments 1 à 6 et le lobe C est composé des segments 7 à 12 (Stephen *et al.*, 2022)

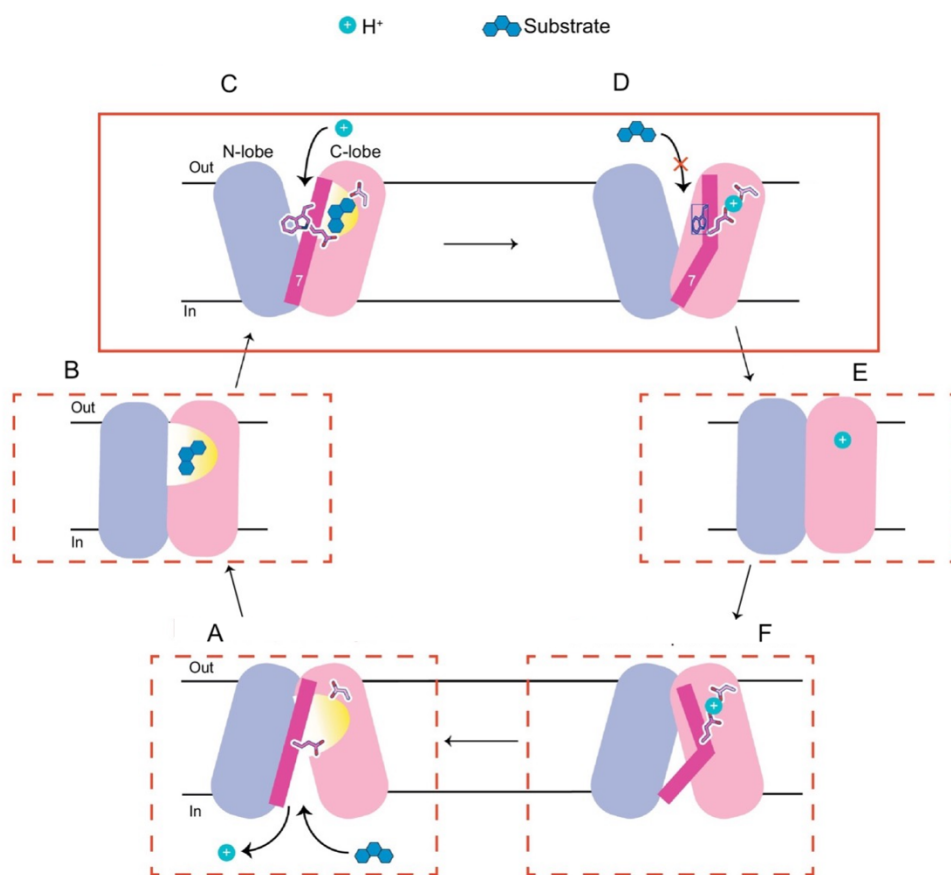


Figure 27 : **Représentation d'un mécanisme de transport d'une pompe à efflux eMATE.** La figure représente un mécanisme de transport putatif proposé pour les pompes à efflux de la famille MATE qui pourrait être partagé par les pompes des sous-famille eMATE et NorM. Dans son état tourné vers l'intérieur (A), le substrat se lie au transporteur au niveau son extrémité C-terminal (C-lobe, en rose). Le transporteur passe ensuite dans un état refermé (B) puis dans un état tourné vers l'extérieur (C). A ce moment, la plus forte affinité de la poche de liaison du transporteur pour les ions  $H^+$  présents dans périplasm que pour le substrat permet la libération du substrat dans le périplasm (C et D). Un rétrécissement de la poche de liaison du substrat empêche celui-ci de se fixer de nouveau et permet le transport des ions dans le sens inverse (D). Les changements de conformation du transporteur résultent d'une modification de la position du segment transmembranaire 7 (représenté en violet) entre un état droit et un état courbé. La membrane interne est représentée par les deux traits noirs avec le périplasm en haut (Out) et le cytoplasme en bas (In) (Adapté de Kusakizako *et al.*, 2020)



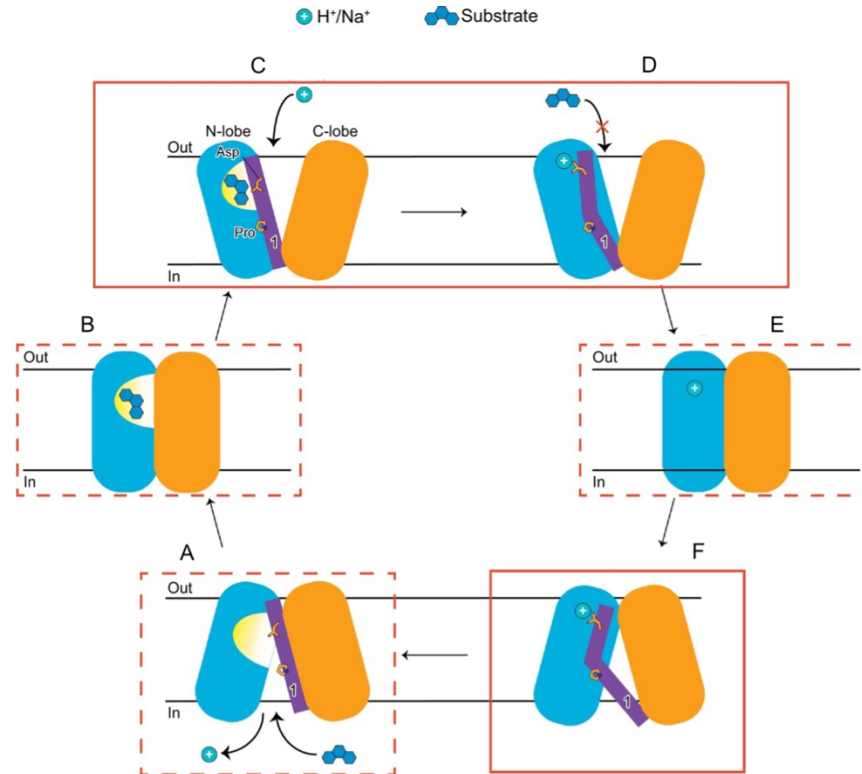


Figure 28 : **Représentation d'un mécanisme de transport d'une pompe à efflux DinF.** La figure représente un mécanisme de transport putatif proposé pour les pompes à efflux de la famille MATE. Dans son état tourné vers l'intérieur (A), le substrat se lie au transporteur au niveau de son extrémité N-terminale (N-lobe, en bleu). Le transporteur passe ensuite dans un état refermé (B) puis dans un état tourné vers l'extérieur (C). A ce moment, la plus forte affinité de la poche de liaison du transporteur pour les ions  $H^+/Na^+$  présents dans le périplasma que pour le substrat permet la libération du substrat dans le périplasma (C et D). Un changement de conformation du segment transmembranaire 1 (représenté en violet) entre un état droit et un état courbé empêche le substrat de se fixer de nouveau et permet le transport des ions dans le sens inverse (D). La membrane interne est représentée par les deux traits noirs avec le périplasma en haut (Out) et le cytoplasme en bas (In) (Adapté de Kusakizako et *al.*, 2020)

MATE eucaryotes (eMATE). Ces transporteurs utilisent un gradient d'ions  $H^+$  et/ou  $Na^+$  de façon à permettre l'excrétion de composés polyaromatiques et cationiques. La structure des membres des sous familles NorM et DinF correspond à deux lobes de 6 segments transmembranaires (l'extrémité N-terminale composée des segments 1 à 6 et l'extrémité C-terminale composée des segments 7 à 12) avec une topologie membranaire analogue à celle observée pour les systèmes de la famille MFS. Ils forment néanmoins un groupe distinct des systèmes MFS en raison de la faible homologie de leur séquence protéique (Kuroda and Tsuchiya, 2009; Mousa et al., 2016; Ranaweera et al., 2015; Tanaka et al., 2013) (Figure 26). Ces systèmes possèdent une cavité centrale en forme de V ouverte sur l'espace extracellulaire, avec un site de liaison au substrat situé au sein de cette cavité. Bien que le transporteur soit orienté ainsi, le transfert du substrat peut avoir lieu dans les deux sens.

Le premier transporteur décrit de cette famille est le système NorM chez *Vibrio parahaemolyticus* (Morita et al., 2000). L'interaction entre les transporteurs NorM et leur(s) substrat(s) se fait via des liaisons ioniques et hydrogènes (Lu et al., 2013; Radchenko et al., 2015). Les transports eMATE et NorM possèdent tous les deux des résidus acides conservés au niveau de leur extrémité C-terminale, suggérant qu'ils partagent des mécanismes de transport similaire (Kusakizako et al., 2020) (Figure 27). Les transporteurs de la sous famille NorM sont capables d'utiliser un mécanisme de transport qui fonctionne par couplage du transport du substrat avec le transfert opposé d'un ion  $Na^+$  (Brown et al., 1999; Morita et al., 2000). Les substrats et les ions  $Na^+$  interagissent avec des acides aminés distincts, et leur liaison à la protéine est probablement médiée par des changements de conformation du transporteur. Lorsqu'il est ouvert du côté cytoplasmique, le substrat se lie au transporteur au niveau son extrémité C-terminale, passe ensuite dans un état refermé puis dans un état tourné vers l'extérieur. À ce moment, la plus forte affinité des ions pour la poche de liaison du transporteur va permettre la libération du substrat dans le périplasma. Un rétrécissement de la poche de liaison du substrat empêche celui-ci de se fixer de nouveau et permet le transport des ions dans le sens inverse (Du et al., 2018).

Les transporteurs de la sous famille DinF sont quant à eux moins décrits dans la littérature. À la différence des systèmes de la sous famille NorM, l'interaction entre le substrat et les transporteurs de la sous famille DinF se fait via des acides aminés hydrophobes (Federici et al., 2005; Lu et al., 2013). Le système YdhE présent chez *E. coli* est un exemple de transporteur DinF capable d'exporter des fluoquinolones et des aminosides (Long et al., 2008). Le mécanisme de transport via les systèmes DinF partage des similitudes avec celui des transporteurs NorM, à l'exception de la poche de fixation du substrat/ion qui se situe sur l'extrémité N-terminale du transporteur, et qu'un changement de conformation du segment 1 du transporteur permet l'échange de fixation entre le substrat et l'ion (Kusakizako et al., 2020) (Figure 28).

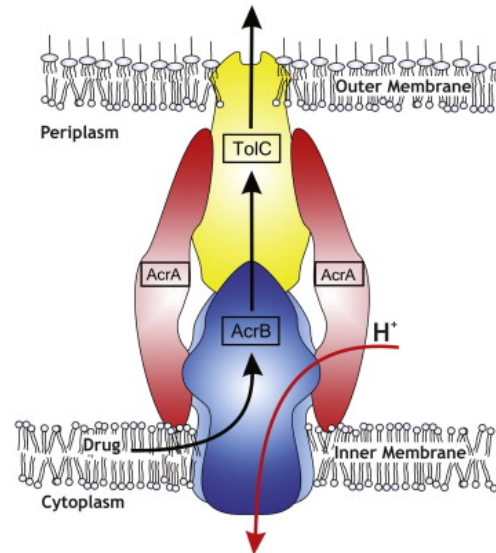


Figure 29 : **Représentation schématique d'une pompe à efflux de la famille RND.** La figure représente un système tripartite d'efflux : la pompe AcrAB-TolC d'*E. coli*. Chez les bactéries à Gram-négatif, les pompes RND sont situées dans la membrane interne et forment un complexe avec deux autres protéines : une protéine de membrane externe appelée OMF (Outer Membrane Factor) qui forme un canal à travers la membrane externe (ici TolC, en jaune) et une protéine de fusion membranaire appelée MFP (Membrane Fusion Protein) située au niveau périplasmique (ici AcrA, en rouge) (Blair and Piddock, 2009)

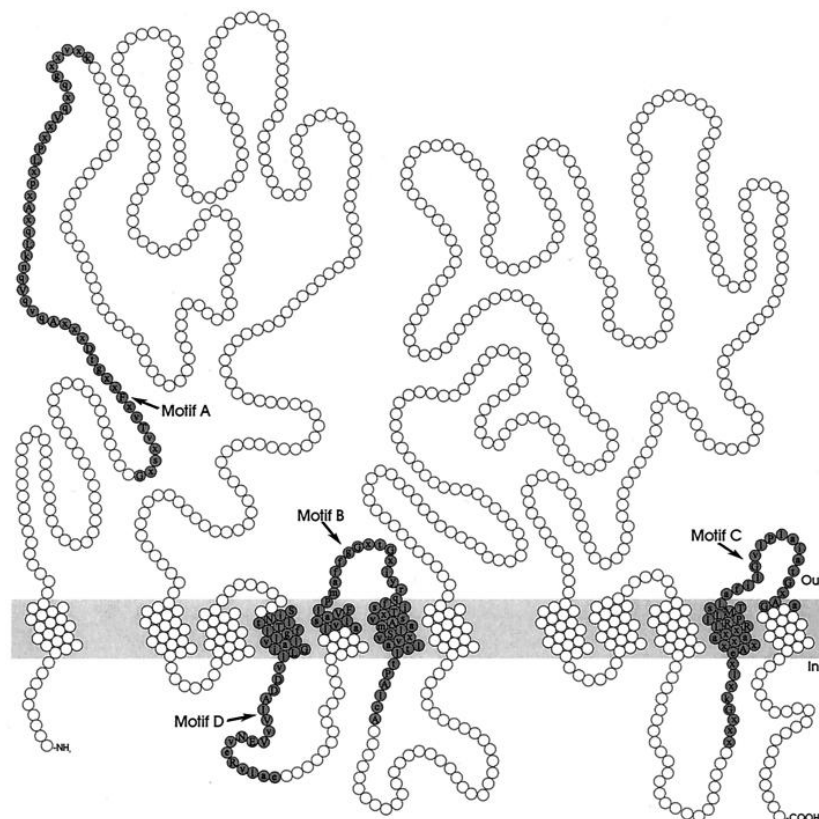


Figure 30 : **Modèle de la structure des pompes à efflux de la famille RND.** Les résidus représentés en gris correspondent aux motifs des séquences conservées. Ces séquences conservées sont retrouvées dans les séquences protéiques de toutes les protéines de transport RND, et elles sont utilisées pour confirmer leur appartenance à cette famille. La membrane interne est représentée en gris avec le périplasm en haut (Out) et le cytoplasme en bas (In) (Putman et al., 2000)

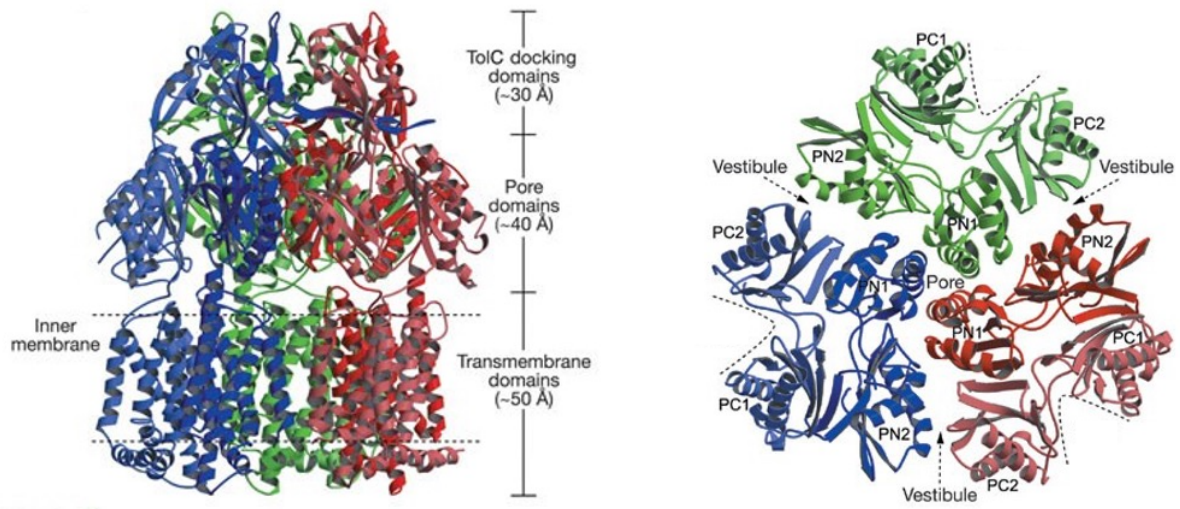


Figure 31 : **Représentation en ruban d'une pompe de la famille RND.** Le schéma de gauche représente la structure homotrimerique de la pompe en vue latérale. Les protéines OMF (TolC) et MPF (AcrA) ne sont pas représentées sur ce schéma. Les trois sous-unités protéiques du complexe sont colorées individuellement (bleu, vert et rouge). La partie périplasmique, représentée en haut sur le schéma, comprend les domaines de reconnaissance du substrat dans sa partie interne et le site d'amarrage de la protéine de membrane externe TolC (TolC docking domains et Pore domains). Le schéma de droite représente une coupe des trois sous-unités protéiques au niveau du site de liaison du transporteur avec la protéine OMF (TolC). Les domaines PN1 de chaque sous-unité protéique forment un pore central fermé, mais une cavité appelée vestibule présente entre les domaines PN2 et PC2 de deux sous-unités voisines permet l'entrée du substrat (Adapté de Murakami et *al.*, 2002).

#### 4.3.4. La famille Resistance-Nodulation-cell Division (RND)

La famille des transporteurs RND est la plus répandue au sein des bactéries à Gram-négatif. Ces transporteurs permettent l'efflux actif d'une large variété de molécules antimicrobiennes de structures très différentes, ce qui leur confère une très large spécificité de substrats et une forte capacité à fournir des résistances multiples aux antibiotiques. En plus des antibiotiques, les substrats de ces pompes peuvent être des acides gras toxiques, des sels biliaries, des hydrocarbures aromatiques, des détergents, des homosérines lactones et des colorants (Fernández and Hancock, 2012). La pompe à efflux de la famille RND la plus décrite est le système AcrAB-TolC retrouvé par exemple chez *E. coli* (Fralick, 1996; Ma et al., 1993) et *Proteus mirabilis* (Visalli et al., 2003). Ces transporteurs confèrent une résistance à une variété d'antibiotiques comprenant la ciprofloxacine, le chloramphénicol, la tetracycline, l'érythromycine, la tigécycline et le triméthoprime, ainsi que des  $\beta$ -lactamines et des fluoroquinolones (Fernández and Hancock, 2012).

Les constituants des systèmes d'efflux RND sont classiquement codés par des gènes regroupés au sein d'un opéron présent sur le chromosome bactérien, mais peuvent aussi plus rarement être retrouvés sur des plasmides (Hansen et al., 2004). Les systèmes RND sont localisés dans la membrane interne. Ils sont principalement des homotrimères relativement larges, comparativement aux autres protéines de membrane. Ces systèmes sont tripartites puisqu'ils fonctionnent en coopération avec deux autres protéines indispensables pour l'efflux efficace du (ou des) substrat(s). En effet, le transporteur en lui-même permet seulement l'excrétion vers le périplasma via un transport à travers la membrane interne. Le substrat est ensuite sécrété grâce à l'action de protéines du périplasma (MFP, Membrane Fusion Protein) et de la membrane externe (OMF, Outer Membrane Factor) (Figure 29). La protéine OMF est une structure dynamique formée d'un tunnel en structure « tonneau » constitué de feuillets  $\beta$  qui traversent la membrane externe et d'un tunnel formé d'hélices  $\alpha$  qui traversent le périplasma. Le complexe transporteur-OMF est stabilisé par la protéine de fusion membranaire (MFP) qui les entoure (Du et al., 2018; Murakami et al., 2006). Néanmoins, il est admis que la capture du substrat par ce transporteur, couplé aux protéines MFP et OMF, peut avoir lieu aussi bien depuis le cytoplasme que depuis l'espace périplasmique (Aires and Nikaido, 2005; Long et al., 2012).

Un transporteur RND est composé de trois domaines protéiques, avec une partie transmembranaire d'environ 1 000 acides aminés organisée en 12 segments et une partie périplasmique composée de deux boucles situées entre les segments 1 et 2 et 7 et 8 (Figures 29 et 30). Les deux boucles périplasmiques possèdent chacune deux domaines nommés PN1 et PN2 (pour la boucle située entre les segments 1 et 2) et PC1 et PC2 (pour la boucle située entre les segments 7 et 8) qui sont responsables de la reconnaissance spécifique du substrat (Elkins and Nikaido, 2002; Tikhonova et al.,

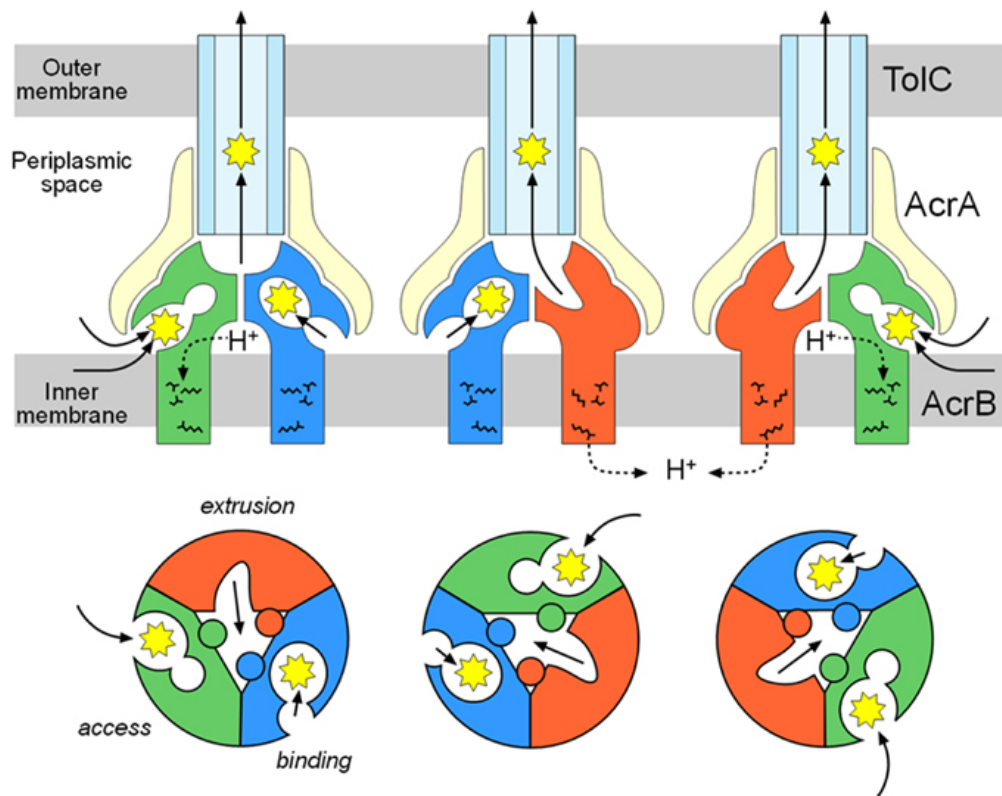


Figure 32 : **Représentation du mécanisme de transport de changements conformationnels rotatifs.** La figure représente le transport d'un substrat par une pompe à d'efflux de la famille RND, la pompe AcrAB-TolC. Le panel supérieur montre le complexe protéique ArcAB-TolC en vue latérale, et le panel inférieur montre la pompe ArcB (homotrimère) en vue de dessus dans les 3 états du processus de rotation fonctionnelle. L'état « access » est représenté en vert, l'état « binding » en bleu et l'état « extrusion » en orange pour les 3 sous-unités de la pompe ArcB. Au sein du complexe AcrB, chacune des 3 sous-unités se trouve dans un de ces 3 état à un temps t. L'étoile jaune représente le substrat qui est transporté à travers les différentes protéines du complexe d'efflux. Les 3 états sont : (i) l'état « access » où la sous-unité est en état de repos, le vestibule d'entrée est ouvert sur le périplasma mais l'accès à la poche de liaison impossible, (ii) l'état « binding » où l'unité protéique se lie au substrat, la poche de liaison est accessible mais n'est pas encore ouverte sur la cavité centrale, et (iii) l'état « extrusion » où la poche de liaison se resserre permettant l'expulsion du substrat vers la protéine OMF (AcrB) (Yamaguchi et *al.*, 2015).

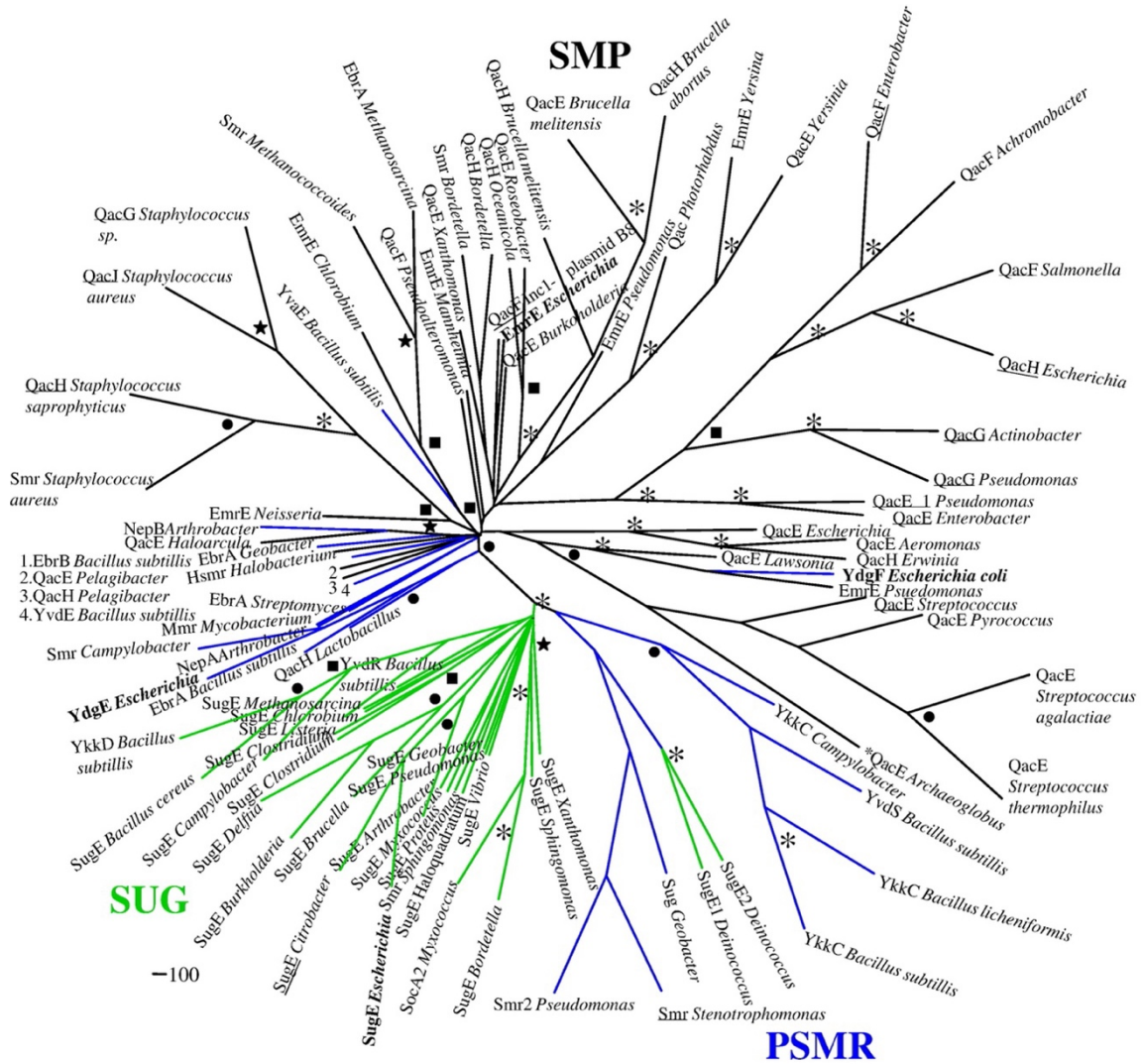


Figure 33 : Arbre de la famille des protéines SMR. L'arbre phylogénique non enraciné est basé sur l'analyse de 101 séquences de protéines SMR. Les protéines SMR codées par des plasmides et des intégrons sont soulignées, et les SMR retrouvées chez *E. coli* sont indiquées en gras. Les branches correspondant aux sous-classes PS MR (bleu), SUG (vert) et S MP (noir) sont indiquées sur l'arbre (Bay et al., 2008).

2002). Les domaines PN1 de trois sous-unités protéiques juxtaposées forment un pore central fermé, mais une cavité appelée vestibule présente entre les domaines PN2 et PC2 de deux sous-unités voisines permet l'entrée du substrat (Figure 31). La plupart des connaissances actuelles sur la structure et le fonctionnement des pompes RND provient des études menées sur le système ArcB d'*E. coli*. Le transport par les pompes RND correspond à un antiport avec un mouvement inverse entre des protons et le substrat (Aires and Nikaido, 2005; Long et al., 2012). Des études structurales et cristallographiques ont révélé qu'ArcB permet l'export du substrat via un cycle de changements conformationnels rotatifs des trois sous-unités protéiques composant le transporteur (Murakami et al., 2006; Seeger et al., 2006). Ces derniers passent chacun leur tour par 3 état successifs : (i) un état « access » où le protomère est en état de repos, avec le vestibule d'entrée ouvert sur le périplasma (et donc l'accès à la poche de liaison aux substrat impossible), (ii) un état « binding » où le substrat est lié au protomère, la poche de liaison étant accessible du côté cytosolique mais pas encore ouverte sur la cavité centrale et (iii) un état « extrusion » où la poche de liaison se resserre et propulse ainsi le substrat vers la protéine OMF (Figure 32). Ces changements conformationnels rotatifs requièrent une force protomotrice qui intervient via la liaison d'un proton lors du passage de l'état « binding » à l'état « extrusion » puis la libération de ce proton lors du passage de l'état « extrusion » à l'état « access » (Pos, 2009).

#### 4.3.5. La famille Small Multidrug Resistance (SMR)

La famille des transporteurs SMR contient plus de 250 membres identifiés dans les bases de données protéiques (NCBI). Les membres de cette famille de pompe ont une grande diversité de structures et de fonctions. Des analyses phylogénétiques ont montré que ces systèmes peuvent être classés en trois sous-groupes : les SMP, les SUG (les supprimeurs de protéine GroEL) et les PSMR (Paired small multidrug pumps) (Bay et al., 2008) (Figure 33).

Les SMR de la classe des SMP, en plus de leur assignation phylogénétique, sont regroupées sur la base de leur fonction et de leur similarité structurale. Elles sont connues principalement pour leur capacité à conférer un caractère de multirésistance aux molécules antimicrobiennes (antibiotiques, composés ammonium quaternaire (QAC), ...). Elles sont retrouvées chez les bactéries à Gram-négatif, comme la pompe Eco-EmrE présente chez *E. coli*, chez les bactéries à Gram-positif, comme la pompe Sau-Smr présente chez *S. aureus*, et chez les archées, comme la pompe Hsmr présente chez *Halobacterium salinarium* (Chung and Saier, 2001; Paulsen et al., 1996; Saier, 2000).

Les SMR de la classe des SUG sont regroupées en fonction de leur distribution phylogénétique mais également du phénotype qu'elles confèrent. Eco-SugE présent chez *E. coli* est le premier membre de



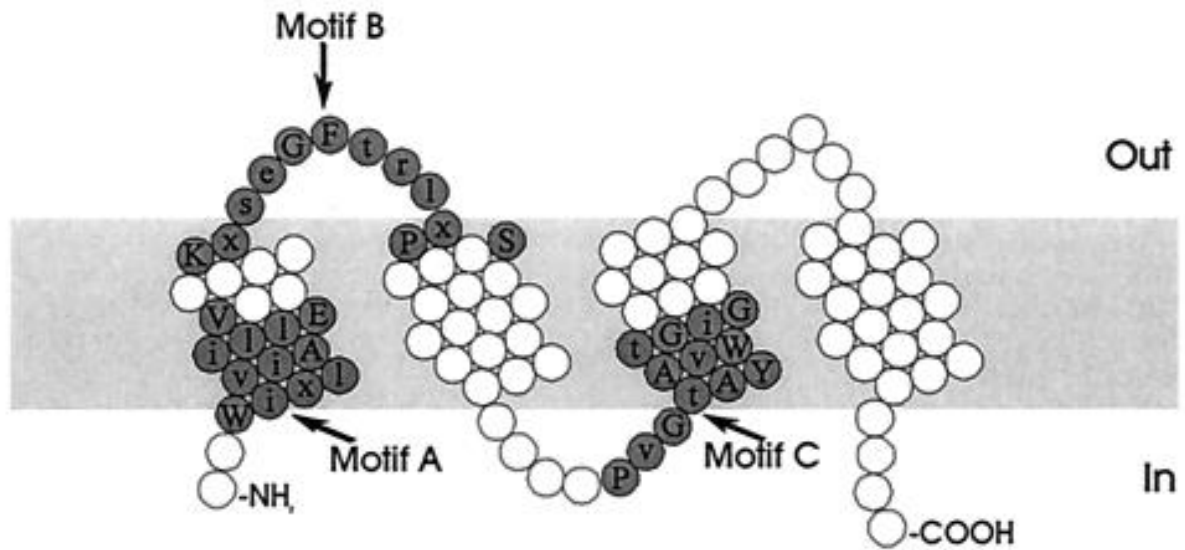


Figure 34 : **Modèle de la structure des pompes à efflux de la famille SMR.** Les résidus représentés en gris correspondent aux motifs des séquences conservées. Ces séquences conservées sont retrouvées dans les séquences protéiques de toutes les protéines de transport SMR, et elles sont utilisées pour confirmer leur appartenance à cette famille. La membrane interne est représentée en gris avec le périplasma en haut (Out) et le cytoplasme en bas (In) (Putman et *al.*, 2000)

la classe SUG à avoir été identifié. Contrairement aux protéines de la classe SMP, les systèmes SUG n'ont la capacité de transporter qu'un spectre étroit de QAC (Chung and Saier, 2002).

Les SMR de la classe des PSMR sont différents des SMP et des SUG en raison de la nécessité de la présence de deux protéines SMR simultanément exprimées pour conférer un phénotype de résistance (Chung and Saier, 2001; Jack et al., 2000; Nishino and Yamaguchi, 2001). Ces pompes confèrent également des résistances aux QAC et à certains colorants cationiques. Dans les deux protéines SMR composant le transporteur PSMR, une est de taille normale alors que l'autre est légèrement plus longue. Ces PSMR sont structurellement uniques grâce à la présence d'une longue boucle hydrophile et d'une extrémité C-terminale étendue sur une des deux sous-unités protéiques. Parmi les PSMR les plus décrites, on retrouve la pompe YdgEF (également désigné comme MdtII) chez la bactérie à Gram-négatif *E. coli*, et la pompe EbrAB chez la bactérie à Gram-positif *B. subtilis* (Kikukawa et al., 2006; Ninio et al., 2001).

L'affinité des pompes SMR pour leur substrat est variable et dépendante de l'activité de la bactérie qui les porte puisque deux SMR homologues peuvent avoir des profils de substrats différents d'une espèce à l'autre (Bay et al., 2008). Les pompes à efflux SMR sont communément décrites pour être impliquées dans la résistance vis-à-vis d'agents antibactériens, notamment à une large variété de QAC comprenant par exemple du méthyl viologène, du chlorure de tétraphénylphosphonium, du chlorure de benzalkonium ou du bromure de cetyltriméthylammonium, mais également vis-à-vis de cations lipophiles comme certains de colorants tels que le bromure d'éthidium, l'acriflavine/proflavine, le crystal violet ou la pyronine (Bay et al., 2008). Les SMR confèrent également des résistances à d'autres molécules, et notamment des antibiotiques comme par exemple la pompe Eco-EmrE qui confère une résistance à l'ampicilline, l'érythromycine ou la tétracycline (Bay et al., 2008; Nishino and Yamaguchi, 2001).

Tous les transporteurs SMR sont des petites protéines d'une centaine d'acides aminés composées de trois motifs conservés. La structure des protéine SMR, partagée par les 3 différentes classes, est constituée de 4 segments transmembranaires arrangés en hélix  $\alpha$  à travers la membrane interne (Figures 21 et 34). Les trois premiers segments transmembranaires forment la chambre de liaison au substrat et le 4<sup>e</sup> segment est principalement impliqué dans l'interaction avec les autres sous-unités protéiques. L'organisation précise des segments au sein de la membrane ainsi que l'orientation (cytoplasmique ou périplasmique) des extrémités N-terminale et C-terminale n'est pas connue. La mise en place de leur activité de transport peut nécessiter l'oligomérisation de ces protéines en homooligomère pour les classes SUG et SMP, et en hétérooligomère pour la classe PSMR. Cependant, la détermination précise de leur état d'oligomérisation reste complexe en raison du manque de consensus dans les données de la littérature (Bay et al., 2008; Chung and Saier, 2001). Le transporteur

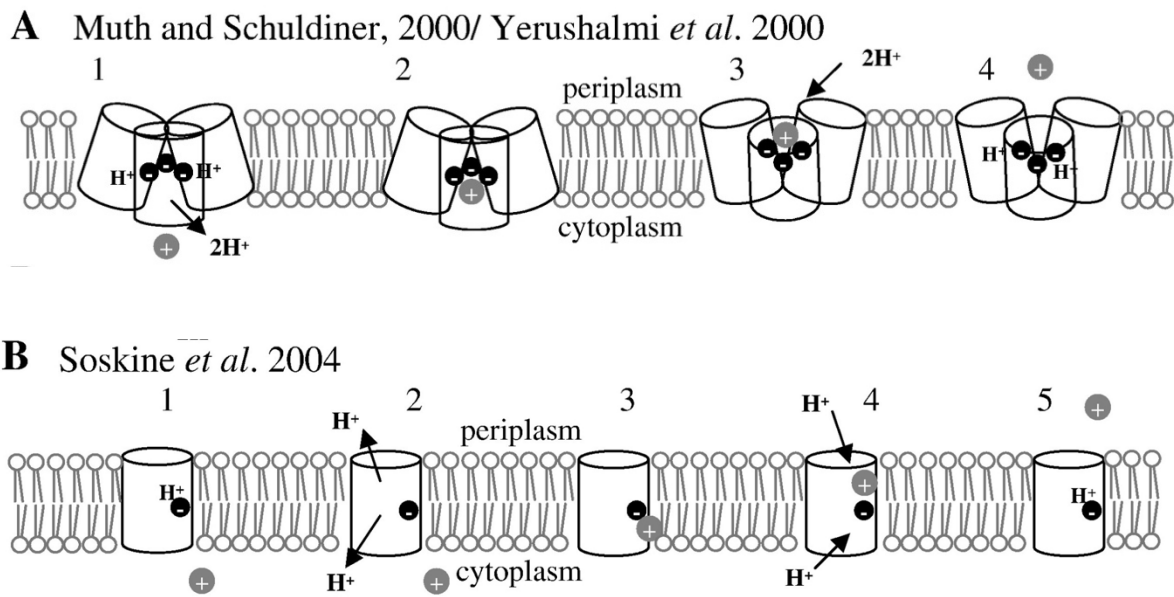


Figure 35 : **Représentations de deux mécanismes de transport des pompes à efflux SMR.** La figure représente deux mécanismes proposés pour le transport par la pompe à efflux EmrE. Les panels représentent la pompe EmrE dans deux états d'oligomérisation différents : organisation en trimère proposée par Muth & Schuldiner et Yerushalmi *et al.* (A), ou organisation en monomère proposée par Soskine *et al.* (B). Le transport du substrat se produit du cytoplasme vers l'espace périplasmique. Les résidus du site de liaison du transporteur sont représentés par les ronds noirs avec un symbole (-) et le substrat est représenté par les ronds gris avec un symbole (+). Les mouvements de protons sont indiqués par des flèches. La chronologie des différentes étapes du mécanisme est représentée par les numéros. Lors du transport, la pompe est présentée dans un état tourné vers l'intérieur (cytoplasme) où la déprotonisation de sa poche de liaison permet au substrat de se fixer. Elle passe ensuite dans un état intermédiaire fermé puis un état tourné vers l'extérieur (périplasm). A ce moment, la plus forte affinité de la poche de liaison du transporteur pour les ions  $H^+$  présents dans périplasm que pour le substrat permet la libération du substrat dans le périplasm. Dans le modèle (B) le flux de proton est décrit comme pouvant avoir lieu dans les deux sens (Muth and Schuldiner, 2000 ; Yerushalmi *et al.*, 2000 ; Soskine *et al.*, 2004) (Adapté de Bay *et al.*, 2008).

Eco-EmrE a été observé dans des états multimériques variés en fonction des conditions expérimentales, comprenant des structures en monomères, dimères, trimères, tétramères ou dimères de dimères (Elbaz *et al.*, 2004; Tate *et al.*, 2003; Ubarretxena-Belandia and Tate, 2004; Winstone *et al.*, 2005; Yerushalmi *et al.*, 1996).

Le mécanisme moléculaire exact du fonctionnement des pompes SMR reste mal connu. Comme les pompes de la classe SMP peuvent prendre en charge de nombreux substrats, il est suggéré qu'elles possèdent un site de liaison au substrat relativement générique. Le fonctionnement de la pompe Eco-EmrE a été largement étudié et plusieurs mécanismes ont été proposés en fonction des différents états d'oligomérisation. Plus d'une dizaine de modèle de transport ont été décrits ; ils ne seront pas détaillés dans ce manuscrit. De façon général, le fonctionnement de cette famille de pompe requière une source d'énergie sous forme de gradient ionique qui varie en fonction de la nature du substrat à transporter (Yerushalmi *et al.*, 1995). Le transport par les pompes SMR est principalement décrit pour être un antiport avec un mouvement inverse entre des protons et le substrat, mais un mécanisme de symport avec un mouvement substrat / protons dans le même sens a été suggéré par Soskine *et al.* pour une pompe EmrE monomérique (Soskine *et al.*, 2004). Quel que soit le mécanisme de transport proposé, le passage du substrat a lieu du cytoplasme vers l'espace périplasmique. Ce transport nécessite 1 à 5 changements conformationnels des sous-unités protéiques du transporteur, faisant passer le système d'un état ouvert vers le cytoplasme, à un état ouvert vers le périplasmie où est libéré le substrat. Les différences notoires entre tous les mécanismes proposés résident dans la localisation et les résidus des sites de liaison du substrat et des ions, et dans les mouvements de protons (protonation/déprotonation) au sein du transporteur permettant de catalyser les changements de conformation du transporteur ou l'expulsion du substrat. Deux exemples de mécanisme de transport de la pompe EmrE en monomère ou en trimère proposés par Muth et Schuldiner, Yerushalmi *et al.* et Soskine *et al.* sont présentés sur la figure 35 (Bay *et al.*, 2008; Muth and Schuldiner, 2000; Soskine *et al.*, 2004; Yerushalmi and Schuldiner, 2000) (Figure 35).

#### 4.4. La spécificité des substrats des pompes à efflux

La spécificité des pompes à efflux vis-à-vis de leur substrat varie de façon importante d'une famille à l'autre, mais également entre les différentes espèces bactériennes. Certains systèmes d'efflux présentent une spécificité de substrat très étroite en ne prenant en charge qu'un faible nombre composé ou un groupe de composés. C'est par exemple le cas de la pompe à efflux TetA faisant partie de la famille MFS. Cette pompe est l'un des premiers transporteurs identifiés chez *E. coli* qui permet l'excrétion spécifique de la tetracycline (Reuter *et al.*, 2020). Par la suite, d'autres pompes à efflux spécifiques à un type d'antibiotique ont été décrites comme la pompe Cmr, qui permet l'excrétion du

chloramphénicol, et la pompe NorA, qui permet l'excrétion de la norfloxacine, toutes les deux faisant partie de la famille MFS. Finalement, les systèmes d'efflux spécifiques à un type de molécule sont peu fréquents puisque la majorité des transporteurs sont capables de se lier à plusieurs composés (Floyd et al., 2013). On peut ainsi considérer que toutes les pompes à efflux sont capables de transporter plusieurs substrats, avec un niveau de spécificité variable allant de « étroit » à « très large » pour des systèmes dits « multidrogues ». Les systèmes d'efflux qui possèdent un spectre large peuvent prendre en charge des composés appartenant à des familles chimiques différentes. Par exemple, le système MexXy-oprM de *P. aeruginosa* peut transporter des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines, des aminosides et des fluoroquinolones (Deplano et al., 2005; Peña et al., 2009).

La spécificité d'un substrat pour un transporteur dépend en grande partie du (ou des) domaine(s) de reconnaissance, et des résidus présents au niveau de la poche de liaison (Nikaido and Pagès, 2012). Lorsqu'une pompe à efflux possède une large gamme de ligands, le site de liaison est constitué d'un motif plutôt « générique » qui peut lier à un grand nombre de composés. Cela peut également s'expliquer par la présence de plusieurs sous-domaines au sein d'une même poche de liaison, ce qui permet la liaison de différents substrats (Nikaido and Pagès, 2012; Pagès and Amaral, 2009). Les mécanismes déterminant la spécificité d'une pompe à efflux ne sont pas encore clairement établis.

#### 4.5. Les fonctions des pompes à efflux

##### 4.5.1. La résistance aux composés toxiques

Bien que les antibiotiques soient des molécules naturellement produites par les microorganismes, leur découverte et leur utilisation intensive par l'Homme a conduit au développement de stratégies de défense par les bactéries, telles que l'acquisition de pompes à efflux. Le rôle des systèmes d'efflux dans la résistance aux antibiotiques est la fonction la mieux décrite, mais ces systèmes assurent également une résistance vis-à-vis d'autres biocides, ou possèdent d'autres fonctions cellulaires, telles que le quorum-sensing, la formation de biofilm ou la virulence.

Les espèces bactériennes qui évoluent dans une multitude d'environnements sont exposées à diverses substances toxiques qu'elles peuvent tolérer grâce à l'acquisition de systèmes d'efflux. Ainsi, les pompes à efflux CzcCBA identifiées chez les bactéries *Ralstonia metallidurans* et *P. aeruginosa*, et la pompe Cus de la bactérie *E. coli* sont impliquées dans la résistance à différents métaux lourds (Nies, 2003; Perron et al., 2004). *E. coli* et *Salmonella enterica* peuvent également tolérer de fortes concentrations de sels biliaires et résister aux acides gras toxiques grâce aux pompes ArcAB et EmrAB (Thanassi et al., 1997; Yoneda et al., 2022). Bien que la pompe à efflux ArcAB soit largement décrite pour son implication dans la résistance aux antibiotiques (tels que la tétracycline, le chloramphénicol, l'ampicilline, la rifampicine et l'acide nalidixique) chez *E. coli*, une étude réalisée par Zgurskaya et

Nikaido a mis en évidence que les sels biliaries seraient les substrats préférentiels de ce système d'efflux (Nikaido and Zgurskaya, 1999; Zgurskaya and Nikaido, 1999). Chez *P. aeruginosa*, la pompe TriABC-OpmH de la famille RND est une pompe avec un spectre très étroit puisqu'elle ne prend spécifiquement en charge le Triclosan (biocide utilisé dans de nombreux produits de soin) et aucune autre molécule antibiotique (Mima et al., 2007). L'avantage pour le pathogène de posséder un système d'efflux spécifique, alors qu'il possède également des systèmes à large spectre de substrat, n'est pas connu.

Les systèmes d'efflux peuvent également jouer un rôle dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en permettant l'excrétion des différents composés métaboliques et déchets du métabolisme hors du cytoplasme (Van Dyk, 2008). C'est le cas par exemple du système YdeE de la famille MFS présent chez *E. coli* qui catalyse l'export d'arabinose en dehors de la cellule, ou encore les systèmes SetAB de la famille MFS également présents chez *E. coli* qui jouent un rôle dans l'excrétion de lactose et de glucose (Koita and Rao, 2012; Liu et al., 1999). Chez *P. aeruginosa*, la pompe à efflux MexEF-OprN permet l'export de la kynurénine, un intermédiaire dans la voie de dégradation du tryptophane et un précurseur de l'anthranilate (Olivares et al., 2012).

#### 4.5.2. La communication intercellulaire ou quorum sensing

Le système du quorum-sensing est un système de communication bactérien mettant en jeu la synthèse, la reconnaissance et la réponse à des molécules signal extracellulaires appelées autoinducteurs, et dont la production est influencée par la densité cellulaire. La présence d'autoinducteurs (AIs) dans le milieu extracellulaire influence ainsi l'expression de nombreux gènes spécifiques impliqués dans des divers comportements bactériens comme la formation de biofilm ou la virulence (Li and Nair, 2012; Li et al., 2007). Les bactéries Gram négatif synthétisent et utilisent couramment des acyl-homosérine lactones (AHLs) comme AIs. Après leur synthèse, les AHLs diffusent librement à travers les membranes cellulaires, mais ils peuvent être également transportés activement par des pompes à efflux à une vitesse beaucoup plus élevée que celle de la diffusion passive (Alav et al., 2018; Lekshmi et al., 2018). Ainsi, la pompe MexAB-OprM de la famille RND chez *P. aeruginosa* a un rôle dans le transport de 3OC12-HSL (Soto, 2013), et la pompe BpeAB-OprB permet l'excrétion de plusieurs types d'homosérines lactones chez *Burkholderia pseudomallei* (Chan and Chua, 2005). Cependant, une surexpression des pompes à efflux peut conduire à une diminution de l'expression des gènes régulés par le QS car une expulsion trop rapide des autoinducteurs du cytosol peut rendre impossible l'activation de l'expression des gènes régulés par ces AIs (Linares et al., 2005). Par exemple, la surexpression de la pompe MexAB-OprM chez *P. aeruginosa* entraîne une réduction de l'expression des facteurs de virulence régulés par le QS (Evans et al., 1998).

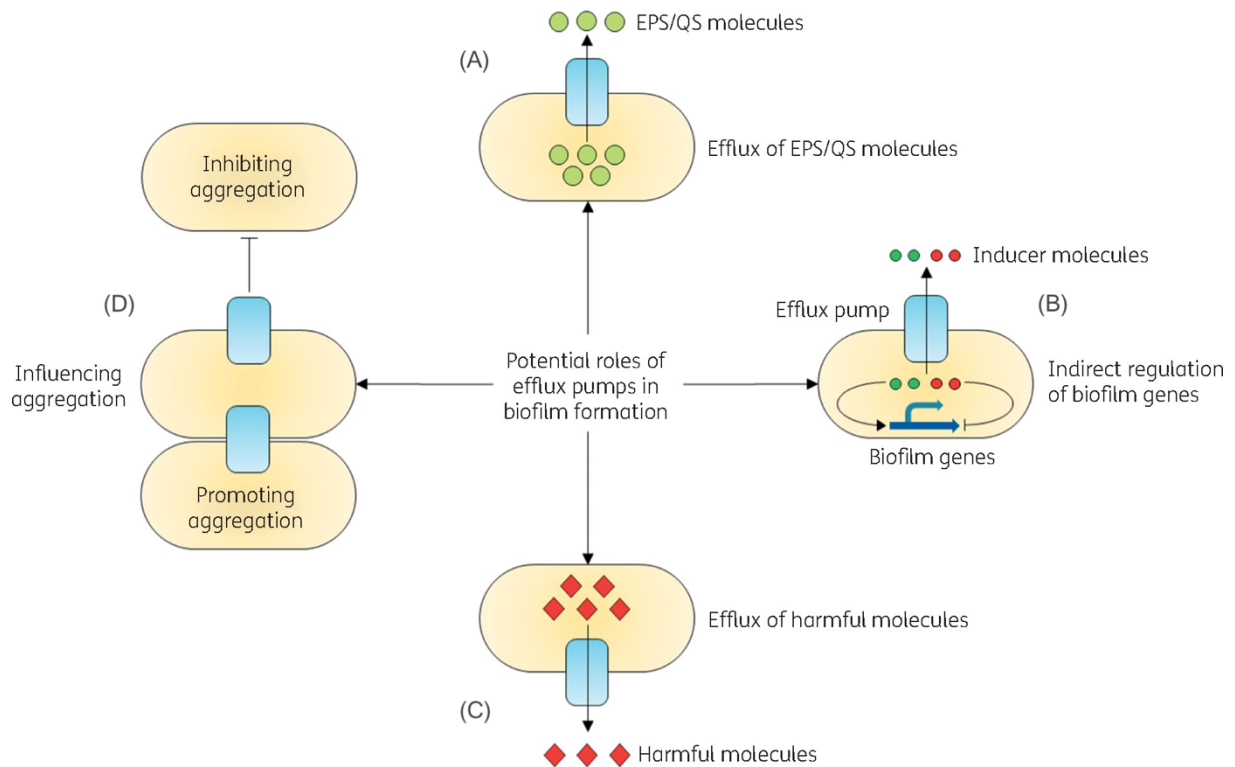


Figure 36 : **Représentation des rôles des pompes à efflux dans la formation de biofilm.** Les pompes à efflux ont été décrites pour 4 rôles potentiels en lien avec la formation de biofilm. (A) Efflux de molécules du quorum-sensing (QS) ou de constituants de la matrice du biofilm tels que des exopolysaccharides (EPS). (B) Régulation indirecte de gènes impliqué dans la formation de biofilm et/ou dans l'adhésion via l'excrétion de composés activateurs ou répresseurs de ces gènes. (C) Maintien du biofilm via l'expulsion de biocides pour lesquels les bactéries ont une susceptibilité. (D) Stimulation ou inhibition des processus d'agrégation intercellulaire et d'adhésion aux surfaces (Alav et al., 2018)

L'implication des pompes à efflux dans le transport des AIs doit néanmoins être pondéré. De nombreuses études ne permettent pas de confirmer précisément que l'activité des transporteurs sur le QS se fait de façon directe, via l'excrétion active des molécules du QS, ou indirecte en agissant sur des régulateurs pouvant activer ou réprimer les gènes du QS (Lekshmi et al., 2018; Minagawa et al., 2012).

#### 4.5.3. La formation de biofilm

Le premier lien entre l'activité des pompes à efflux et la formation de biofilm a été mis en évidence lorsque des gènes codant des systèmes d'efflux ont été retrouvés surexprimés chez des bactéries sessiles, comparativement aux bactéries planctoniques. Ainsi, l'analyse globale de l'expression des gènes dans des bactéries sessiles *E. coli* a permis d'identifier la surexpression de plusieurs gènes codant des protéines de transport, dont des pompes RND et ABC codées respectivement par les gènes *mdtF* et *IsrA*.

Différentes familles de pompes à efflux peuvent jouer un rôle dans la formation et le maintien des biofilms par le biais de quatre mécanismes (Schembri et al., 2003) (Figure 36). (i) En permettant l'excrétion de composés nocifs, les pompes peuvent maintenir la survie des bactéries au sein d'un biofilm. Par exemple, une souche mutante délétée des gènes *acrB*, *acrE* et *tolC* est affectée dans la perméabilité de sa membrane et présente une réduction importante de la viabilité cellulaire au sein d'un biofilm. En effet, les auteurs ont montré que les bactéries déficientes dans ces systèmes d'efflux possèdent une susceptibilité augmentée à divers composés antimicrobiens (trobamycine, tétracycline et benzalkonium) au sein d'un biofilm, comparativement aux bactéries sauvages qui ne sont pas affectées (Bay et al., 2017). (ii) Les pompes à efflux peuvent faciliter la formation du biofilm en permettant l'export de molécules impliquées dans le quorum-sensing, mais également de composés présents dans la matrice du biofilm. Par exemple, May et al. ont montré que la surexpression de la pompe à efflux TetA de la famille MFS provoque des changements dans les propriétés de surface des bactéries, ce qui conduit à un stress osmotique et induit la production d'acide colanique, un polysaccharide capsulaire important pour la maturation de la matrice du biofilm chez *E. coli* (May et al., 2009). Également, la pompe YhdX de la famille ABC chez *E. coli* jouant un rôle dans le transport de L-acides aminés à travers la membrane, ce qui permet de stabiliser la matrice du biofilm via des interactions électrostatiques et de type Van der Waals (Flemming and Wingender, 2010; Riley et al., 2006). (iii) Les pompes à efflux influencent la formation du biofilm en régulant de façon indirecte l'expression de certains gènes, via l'excrétion de molécules régulatrices. Par exemple, des mutants de *E. coli* qui surexpriment les gènes d'efflux *adeABC* et *adeIJK* présentent une sous-expression de gènes codant des systèmes fimbriaux, ce qui limite leur capacité d'adhésion et de colonisation des surfaces



(Yoon et *al.*, 2015). Cette corrélation négative entre la surexpression des pompes à efflux et la diminution de l'expression des fimbriae pourraient résulter de l'export d'un composé qui est normalement nécessaire pour induire la formation de biofilm. Enfin, (iv) les pompes à efflux peuvent stimuler la formation de biofilm en influençant les phénomènes d'agrégation, d'adhésion aux surfaces et aux autres cellules. La pompe à efflux AraJ de la famille MFS et la pompe EmrD de la famille SMR sont capables de transporter des polymères d'arabinose, une molécule qui joue un rôle dans l'agrégation cellulaire (Bahat-Samet et *al.*, 2004; Koita and Rao, 2012).

#### 4.5.4. La virulence

L'expression de pompes à efflux est essentielle au processus physiopathologique de certaines bactéries. Les travaux de Nishino et *al.* ont montré que la présence des pompes MdtABC, MdsABC et MacAB chez *Salmonella* est requise pour l'expression de la virulence dans un modèle murin d'infection par voie orale (Nishino et *al.*, 2006). Ces résultats ne permettent pas d'identifier le mécanisme par lequel les pompes favorisent la virulence. Il peut s'agir d'une action via la production d'effecteurs impliqués dans la virulence ou en facilitant la mise en place de l'infection via des mécanismes de résistance ou de colonisation augmentée. Il existe quelques exemples de pompes à efflux avec un rôle direct dans la pathogénicité via l'export de facteurs de virulence (Li and Nikaido, 2009). La pompe MacAB-TolC produite par des souches entérotoxigéniques d'*E. coli* favorise la virulence en permettant la sécrétion d'un peptide toxique, l'enterotoxine II (Yamanaka et *al.*, 2008). Hirakata et *al.* ont montré que la pompe à efflux MexAB-OprM de *P. aeruginosa* joue un rôle dans le processus invasif et la virulence du pathogène ; un mutant  $\Delta mexAB-oprM$  déficient dans la production de cette pompe présente une réduction de l'invasion des cellules rénales MDCK (Madin-Darby canine kidney) et une réduction de létalité dans un modèle murin de septicémie (Hirakata et *al.*, 2002). Également, des mutants de *S. Typhimurium* délété du transporteur AcrB n'ont plus la capacité à envahir les macrophages *in vitro* comparativement aux souches sauvages (Buckley et *al.*, 2006). De façon plus indirecte, la surproduction des pompes MexAB-OprM et MexXY-OprM chez *P. aeruginosa* augmente la virulence de la bactérie via la régulation des gènes de virulence par le QS (Evans et *al.*, 1998; Salunkhe et *al.*, 2005). La pompe MexAB contribue ainsi au succès de clones épidémiques grâce à son rôle d'export de déterminants de la virulence (Deplano et *al.*, 2005). L'impact des systèmes d'efflux sur la virulence bactérienne est très variable, dépendant de la pompe mais également du microorganisme. Dans certains cas, l'expression des systèmes entraîne une diminution de la virulence, par exemple chez *Stenotrophomonas maltophilia* qui présente une virulence atténuée lorsque la pompe SmeDEF est surexprimée. Une analyse du profil métabolique des bactéries a permis de montrer que cette

diminution de la virulence résulte d'un surcharge métabolique créée par la surproduction de la pompe (Alonso et al., 2004).

#### 4.6. Les pompes à efflux chez *K. pneumoniae*

Comme c'est le cas pour beaucoup d'autres bactéries Gram négatif, les bactéries de l'espèce *K. pneumoniae* possèdent des pompes à efflux appartenant à chacune des 5 familles (ABC, MFS, MATE, RND et SMR). Plusieurs études réalisées sur des isolats cliniques ont mis en évidence que la multirésistance aux antibiotiques des bactéries du genre *Klebsiella spp.*, et plus précisément de l'espèce *K. pneumoniae*, est due à une surexpression des systèmes d'efflux de différentes familles (Bialek et al., 2010; Bratu et al., 2009; Davin-Regli et al., 2008; Padilla et al., 2010; Pagès and Amaral, 2009). En effet, un niveau d'efflux élevé est observé chez des souches multirésistantes isolées chez des patients sous antibiothérapie colonisés ou infectés par *Klebsiella*. Le système KdeA notamment, un membre de la famille MATE, est décrit pour son rôle dans la résistance aux antibiotiques comme la norfloxacine et le chloramphénicol (Ping et al., 2007).

Certaines souches de *K. pneumoniae* portent sur leur chromosome jusqu'à 15 éléments génétiques codant des pompes à efflux (Wu et al., 2009). Ces transporteurs ne sont pas systématiquement exprimés, mais peuvent être « activés » lors de conditions environnementales ou physiologiques particulières. Par exemple, les bactéries dispersées de biofilm de *K. pneumoniae*, qui correspond à un état physiologique conférant un niveau de pathogénicité plus élevé, surexpriment certains systèmes d'efflux comme la pompe CusA responsable du transport de molécules de cuivre et d'argent.

Les pompes décrites chez *K. pneumoniae*, en plus de fournir à la bactérie un phénotype de résistance antibiotique, peuvent intervenir dans une multitude de fonction. Les systèmes KmrA et KpnGH de la famille MFS sont à l'origine de résistances à diverses substances comprenant par exemple l'acriflavine, le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), le méthyl viologène ou encore le bromure d'éthidium (Ogawa et al., 2006; Srinivasan et al., 2014). Les pompes à efflux de *K. pneumoniae* peuvent également jouer un rôle dans les processus de pathogénicité et la virulence ; ainsi la pompe EefABC est impliquée dans le processus de colonisation du tube digestif comme démontré dans un modèle murin (Coudeyras et al., 2008). La pompe à efflux AcrAB, appartenant à la famille des transporteurs RND, confère à *K. pneumoniae* des résistances à une large gamme d'antibiotiques dont les céphalosporines, les fluoroquinolones, la gentamycine et l'érythromycine. Elle a également été décrite pour contribuer à la virulence de *K. pneumoniae* au niveau pulmonaire ; des mutants déficients dans le système AcrAB ont une susceptibilité augmentée aux molécules antimicrobiennes présentes dans le fluide des lavages bronchoalvéolaires humains et présentent ainsi une atténuation de leur capacité à déclencher une infection pulmonaire dans un modèle murin de pneumonie (Padilla et al., 2010). La pompe à efflux

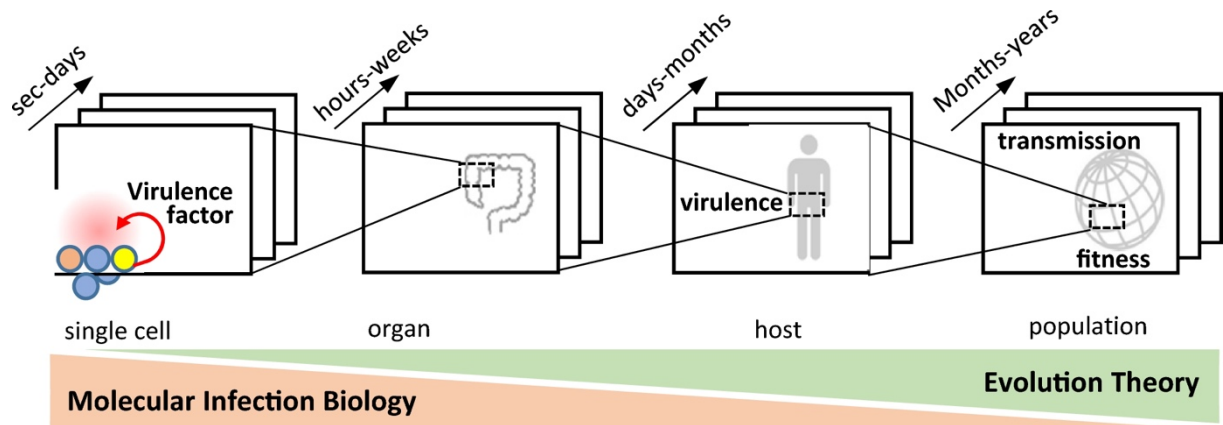


Figure 37 : **Représentation des différentes échelles d'étude de la virulence.** La biologie évolutive et la biologie moléculaire se concentrent sur différents niveaux d'étude (la cellule, l'organe, l'hôte, la population) pour caractériser les interactions hôte-pathogènes et la virulence. (Diard and Hardt, 2017)

KpnEF, appartenant à la famille des SMR, a été identifiée comme élément essentiel pour l'infection par *K. pneumoniae* car ce système d'efflux fait partie du régulon Cpx qui est impliqué dans diverses fonctions de la physiologie bactérienne. De plus, la pompe KpnEF est impliquée dans la formation de biofilm et la synthèse de capsule via la régulation l'opéron capsulaire mais aussi potentiellement via le transport de polysaccharides à la membrane externe (Srinivasan and Rajamohan, 2013).

## 5. La virulence bactérienne

Le pouvoir pathogène d'un microorganisme correspond à sa capacité à infecter l'hôte et à provoquer des troubles infectieux, c'est une notion qualitative, alors que la virulence bactérienne est une notion quantitative puisqu'elle correspond aux différents niveaux de pathogénicité d'une bactérie. Pour un même pouvoir pathogène, un microorganisme peut ainsi être plus ou moins virulent. La virulence est un concept dynamique qui évolue génétiquement via l'acquisition de gènes codant des déterminants de la virulence, un phénomène médié en partie par l'environnement auquel la bactérie est exposée. La virulence peut être étudiée grâce à la biologie moléculaire qui se concentre sur les mécanismes de l'infection via la caractérisation des facteurs bactériens, mais également grâce à la biologie de l'évolution avec laquelle la virulence est considérée comme un des nombreux paramètres affectant la fitness et la propagation du pathogène dans les populations hôtes (Diard and Hardt, 2017). La biologie de l'évolution permet de développer des modèles mathématiques qui prédisent la diffusion des pathogènes dans la population, et donc de comprendre la valeur adaptative de la virulence. La biologie moléculaire s'intéresse à la description de l'interaction entre le pathogène et son hôte en se concentrant sur les facteurs de virulence des microorganismes, de façon à comprendre les symptômes observés (Diard and Hardt, 2017) (Figure 37).

Les souches de *K. pneumoniae* sont séparées en deux groupes : les souches classiques et les souches hypervirulentes qui possèdent un grand nombre de facteurs de virulence spécifiques. Bien que ces dernières soient actuellement les plus utilisées pour évaluer les propriétés de virulence de *K. pneumoniae*, il est important de noter que les souches classiques (comprenant les souches multirésistantes) possèdent également un pouvoir pathogène. Contrairement aux souches hvKp, les souches classiques ne sont pas toujours capables de conduire une infection. En effet, l'expression de facteurs de pathogénicité n'explique pas à elle seule la capacité d'une bactérie à conduire à l'infection, mais d'autres aspects comme la susceptibilité de l'hôte sont également à prendre en compte. Par exemple, *Neisseria meningitidis* peut rester non invasive chez des porteurs humains malgré la présence de facteurs associés à la virulence comme la capsule et le pili de type IV (Laver et al., 2015).

*K. pneumoniae* possède de nombreux processus pour s'implanter, coloniser et se protéger des agressions extérieures, comme du système immunitaire, dans les différents sites de son hôte (urinaire,

intestinal, pulmonaire). Par exemple, la production de capsule par les souches de *K. pneumoniae* permet de limiter la phagocytose de la bactérie par les cellules de l'immunité et la mise en place d'une réponse immunitaire efficace (Domenico et al., 1994; Evrard et al., 2010). Également, la présence de fimbriae de type 1 contribue à l'invasion des cellules et à la formation de biofilm dans la vessie au cours d'une infection urinaire (Rosen et al., 2008a; Struve et al., 2008). Les stratégies mises en place par *K. pneumoniae* semblent tendre d'avantage vers un mode défensif plutôt qu'offensif lors de l'infection, comparativement à d'autres pathogènes (Paczosa and Meccas, 2016). Alors que *K. pneumoniae* se protège du système immunitaire en formant du biofilm ou produisant une capsule notamment, d'autres espèces comme *Yersinia* utilisent par exemple des systèmes de sécrétion de type III pour injecter directement des toxines dans les cellules immunitaires afin d'inactiver la capacité de réponse de l'hôte (Trosky et al., 2008).

De nombreux facteurs de virulence de *K. pneumoniae* (la capsule polysaccharidique, le lipopolysaccharide (LPS), les sidérophores, l'uréase et les fimbriae) ont été décrits dans la littérature (Paczosa and Meccas, 2016), et plusieurs nouveaux facteurs jouant un rôle prépondérant dans le processus infectieux ont été décrits dans plusieurs études récentes (Gato et al., 2020; Hsieh et al., 2019; Khater et al., 2015; Lery et al., 2014). Dans le processus infectieux, il est parfois difficile de définir le rôle précis des facteurs de virulence en raison de la multitude de déterminants de pathogénicité portés par les souches de *K. pneumoniae*, ainsi que de la complexité de l'infection qui résulte de l'action conjointe de nombreuses fonctions bactériennes. Le développement de modèles d'infections *in vivo*, et plus particulièrement des modèles murins, est indispensable à l'étude et à la compréhension de la physiopathologie des infections à *K. pneumoniae*.

Publication n°1 (voir également annexe 1)

## **From *K. pneumoniae* colonization to dissemination: an overview of studies implementing murine models**

Laura Joseph †, Thomas Merciecca †, Christiane Forestier, Damien Balestrino ‡, and Sylvie Miquel ‡

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors contributed equally to this work.

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, Université Clermont Auvergne, CNRS,  
F-63000 Clermont-Ferrand, France

Publication acceptée le 09/06/2021 dans le journal **Microorganisms**

## Abstract

*Klebsiella pneumoniae* is a Gram-negative pathogen responsible for community- acquired and nosocomial infections. The strains of this species belong to the opportunistic group, which is comprised of the multidrug-resistant strains, or the hypervirulent group, depending on their accessory genome, which determines bacterial pathogenicity and the host immune response. The aim of this survey is to present an overview of the murine models mimicking *K. pneumoniae* infectious processes (ie gastrointestinal colonization, urinary, pulmonary and systemic infections), and the bacterial functions deployed to colonize and disseminate into the host. These *in vivo* approaches are pivotal to develop new therapeutics to limit *K. pneumoniae* infections via modulation of the immune responses and/or microbiota.

## Keywords

*Klebsiella pneumoniae*; *in vivo* murine models; colonization and virulence factors; new therapeutics

## Introduction

*Klebsiella pneumoniae* is a Gram-negative non-motile and encapsulated bacterium found in environmental conditions as diverse as soil, plant leaves, mammalian intestine and waste waters (Bagley, 1985b; Podschun et al., 2001). It is an opportunistic pathogen able to colonize the mucosal epithelium of the gut and nasopharynx and to disseminate into the deep tissues and blood-stream of susceptible patients, causing severe infections such as pneumonia, meningitis, endophthalmitis, pyogenic liver abscesses and bacteremia (Donskey, 2004; Gonzalez-Ferrer et al., 2021; Paczosa and Meccas, 2016; Podschun and Ullmann, 1998). The ability of this bacterium to form biofilm on invasive medical devices leads to subsequent health-care associated infections, particularly in the urinary and pulmonary tracts (Paczosa and Meccas, 2016). *K. pneumoniae* infections are difficult to treat, in particular because of the pathogen's high endogenous antibiotic resistance. For example, *K. pneumoniae* is intrinsically resistant to ampicillin owing to the presence of  $\beta$ -lactamase (SHV-1) encoding genes in its chromosomal genome (Holt et al., 2015). In addition it was incriminated for the appearance of multidrug resistant (MDR) strains against third generation cephalosporins, fluoroquinolones, carbapenem and aminoglycosides (Grall et al., 2011; Wyres and Holt, 2018). The correlation between its wide ecological range and its ability to carry multidrug resistance genes makes of *K. pneumoniae* a good candidate for dissemination and horizontal gene transfer among the Gram-negative species. This pathogen contributes to a large diffusion of widespread antibiotic resistance genes especially in its diverse niches (Wyres and Holt, 2018). However, the severity of the infections engendered by *K. pneumoniae* is rarely linked to the antibiotic resistance profile of the incriminated strains but depends rather on the accessory genome that conditions bacterial pathogenicity.

Clinical strains of *K. pneumoniae* can be divided into two main categories, the classical group (cKp) comprising MDR strains, and the hypervirulent (hvKp) group of strains (Gonzalez-Ferrer et al., 2021). cKp strains are usually hosted in the gastrointestinal (GI) tract of patients with intestinal portage, the incidences of which are estimated to be between 6 and 19% (Gorrie et al., 2017; Wyres and Holt, 2018). The molecular mechanisms leading to the emergence of *K. pneumoniae* infections in immunocompromised patients are unclear, but intestinal colonization is significantly associated with subsequent infections (Jung et al., 2019; Martin et al., 2016; Peña et al., 1997). Indeed, whole genome sequencing of *K. pneumoniae* strains isolated from rectal swabs and clinical samples of the same patients showed that ~50% of *K. pneumoniae* infections result from the patients' own microbiota (Gorrie et al., 2017). The impairment of microbiota colonization resistance gives rise to a bloom of *K. pneumoniae* cells within the intestinal tract and is thus likely to represent an early step in the progression of these infections (Taur et al., 2012). HvKp strains are emerging variants of cKp that, unlike cKp strains, cause organ and life-threatening infections even in healthy immunocompetent



**Table 1:** *In vivo* investigated readouts in classical *K. pneumoniae* and hypervirulent *K. pneumoniae*.

Model	Inoculation Mode	Read-Out	Technique	Strains		References		
				cKp <sup>a</sup>	hvKp <sup>b</sup>			
Gastrointestinal colonization	Intragastric	Colonization levels	CFU counting	☑	☑	[13,27,30–32,34,35,37–39,43,45–51,53–55,137]		
		Host status and immune response	Histopathology	☑		[30,49,50,52]		
			Cytokine quantification	☑		[43,49,52]		
			Inflammatory marker measurement	☑		[40,49–52]		
		Microbiota modification	FISH	☑		[27,31,50–52]		
			Microscopy	☑		[50]		
			16S DNA sequencing	☑		[13,27,43,48,50]		
Systemic dissemination	Intragastric	Colonization levels	CFU counting		☑	[33,62,64,66,71]		
		Host status and immune response	Histopathology		☑	[33,64]		
			Cytokine quantification		☑	[33]		
	Microscopy			☑	[63]			
	Intravenous	Lethality	Survival		☑	☑	[64,69]	
		Colonization levels	CFU counting	☑	☑		[16,83–85]	
			Host status and immune response	Histopathology		☑		[83,85]
			Cytokine quantification			☑	[83–85]	
	Intraperitoneal	Lethality	Survival	☑	☑		[60,73,83,85]	
			Colonization levels	CFU counting	☑	☑		[61,69,71,76–78,150,155]
			Host status and immune response	Histopathology	☑	☑		[44,68,76,155]
		Lethality	Cytokine quantification	☑	☑			[77–79,155,159]
			Inflammatory marker measurement	☑	☑			[150,155,159]
			Microscopy	☑	☑			[61]
			Microbiota modification	16S Sequencing	☑	☑		[155]
Subcutaneous	Lethality	Survival	☑	☑		[16,61,68–70,76–79,82,150,155,156,159]		
		Colonization levels	CFU counting	☑	☑		[59,122]	

<b>Pulmonary infection</b>	Intranasal	Host status and immune response	Liver abscess measurement	☑	☑	[59]	
		Lethality	Survival	☑	☑	[80–82,122]	
		Colonization levels	CFU counting	☑	☑	[109–112,112–117,121,123,127,131,133,148,151–154,157]	
		Host status and immune response	Cytokine quantification	☑	☑	[110,114,115,117,119,127,131,133,148,153]	
			Histopathology	☑	☑	[109,110,112,112,113,117,133,148,153,154,157]	
	Intratracheal			Inflammatory marker measurement	☑	☑	[110,113,115,117,123,148]
				Microscopy		☑	[148]
		Lethality	Survival	☑	☑	[109,112,116,117,119,151,153]	
		Colonization levels	CFU counting	☑	☑	[97–107,118,120,122,124,125,128–130,149,158]	
		Host status and immune response	Cytokine quantification	☑	☑	[98–101,106,129,130]	
<b>UTI</b> <sup>c</sup>	Intraurethral		Histopathology	☑	☑	[95–99,101–103,118,125,130]	
			Inflammatory marker measurement	☑	☑	[98–101,107,128]	
			Microscopy		☑	[103,125]	
		Lethality	Survival	☑	☑	[81,95,96,98,99,120,122,124,129,130,149,158]	
		Colonization levels	CFU counting	☑		[35,36,41,136–139,141–144,146]	
<b>CAUTI</b> <sup>d</sup>	Intraurethral	Host status and immune response	Histology	☑		[142–144]	
			Microscopy	☑		[138,142,143]	
		Colonization levels	CFU counting	☑		[145]	

<sup>a</sup> cKp: Classical *K. pneumoniae*, <sup>b</sup> hvKp: Hypervirulent *K. pneumoniae*, <sup>c</sup> UTI: Urinary tract infection,

<sup>d</sup> CAUTI: Catheter-associated urinary tract infection.

individuals. hvKp strains are considered as strict pathogens that cause infections at multiple sites including pyogenic liver abscess, pneumonia, endophthalmitis, meningitis, and necrotizing fasciitis followed by metastatic spreading (Gonzalez-Ferrer et al., 2021; Kabha et al., 1995). The specific traits of hvKp were discussed in depth in a recent review published by Russo and Marr (Russo and Marr, 2019). The understanding of the mechanisms of evolution from cKp to hvKp-specific virulence, however, is still incomplete. Hypervirulent strains belong mostly (around 70%) to K1 or K2 capsular serotypes (Pomakova et al., 2012; Shon et al., 2013; Paczosa and Meccas, 2016; Li, 2019). HvKp strains always harbor one large plasmid, pLVPK (or highly similar pK2044), that is composed of many virulence genes such as *rmpA*, *magA* and *iro* and *iuc* operons, which are responsible for aerobactin synthesis (Kislichkina et al., 2017; Wu et al., 2009). Although most hvKp isolates are susceptible to antibiotics, the acquisition of extensive or pan-antimicrobial resistance has the potential to create the ultimate superbug, notably by acquisition of genes encoding extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and carbapenemases (Li et al., 2014b; Holt et al., 2015; Martin and Bachman, 2018).

Several *in vitro* studies have characterized the pathogenicity of *K. pneumoniae* strains and described the underlying molecular mechanisms and their immune evasion strategies (Gonzalez-Ferrer et al., 2021). The development of innovative *in vitro* models is promising, but the complexity of the host physiology (immunity, microbiota, and dynamics of physico-chemical conditions) is often difficult to reproduce in a single *in vitro* model. These data often need to be complemented by *in vivo* experiments to obtain a high reality scale and a better understanding of host-pathogen interactions (Bengoechea and Sa Pessoa, 2019). Although ethics statements applied to *in vivo* models impose a strict control and limitation of their use, they are nevertheless indispensable to gain fuller understanding of the infectious processes. Mammalian models are the most frequently used, owing to their reliability in mimicking human infections associated with *K. pneumoniae* (Bengoechea and Sa Pessoa, 2019). The present review focuses on murine models (ie intestinal, pulmonary, urinary and bacteremia) and their readouts to study *K. pneumoniae* processes of colonization and infection, and the bacterial factors involved (Table 1). The potential therapeutic approaches to counteract the establishment or progression of the pathogen are also discussed.

### 5.1. Intestinal colonization

In humans, *K. pneumoniae* colonizes the intestinal microbiota and the establishment of this niche is considered as a starting point for dissemination and further infection (Fung et al., 2012; Gorrie et al., 2017). Several murine models of intestinal colonization have thus been developed to study this pathophysiological process. Mice are an excellent tool to study *K. pneumoniae* gut colonization because they are easy to manipulate, access to fecal content is easy, and they have a high reproductive

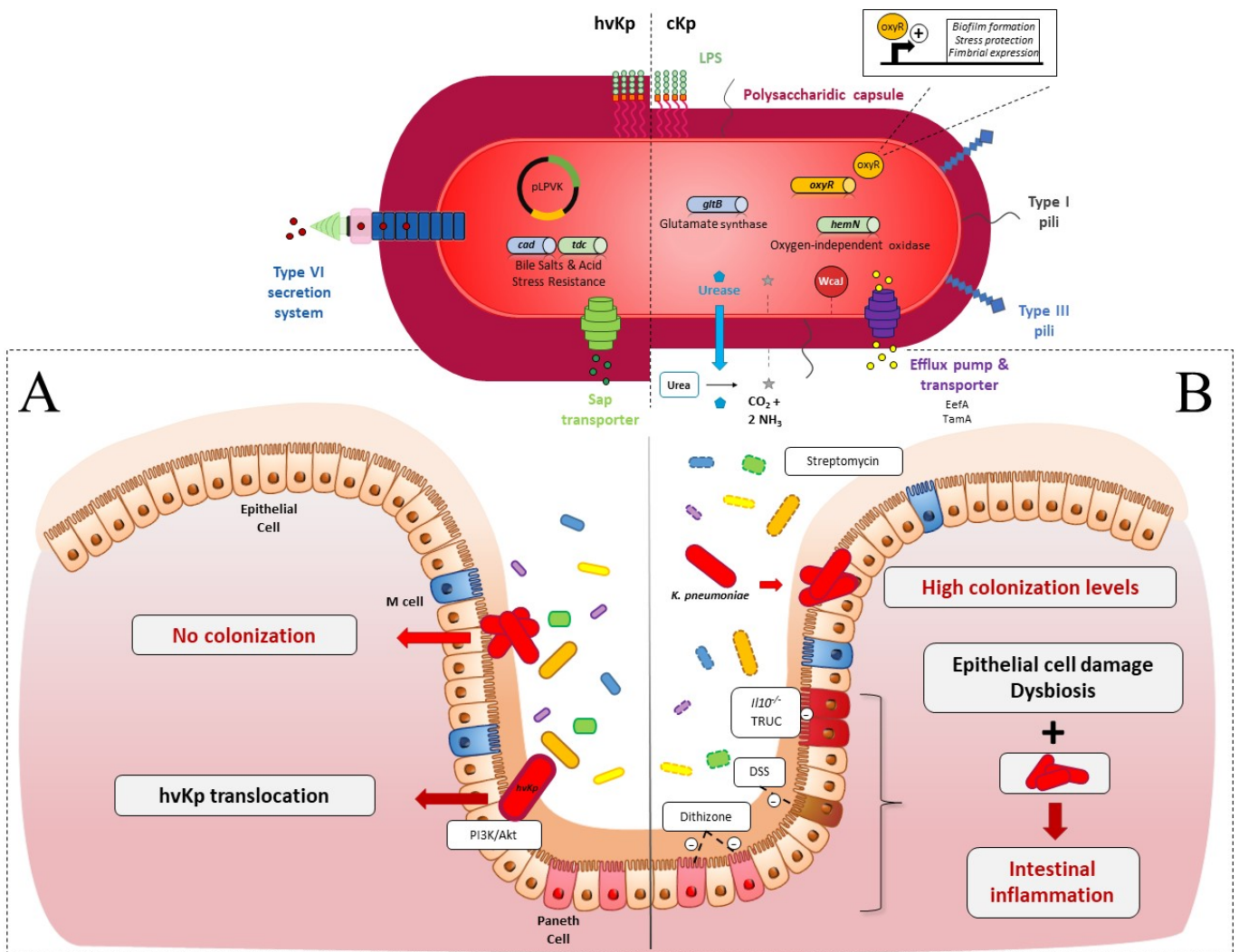


Figure 38 : *K. pneumoniae* in the gastrointestinal (GI) tract in an *in vivo* murine model. (A) In healthy immunocompetent mice: (i) cKp (red oval, fine capsule) is not able to colonize the intestinal epithelium due to the presence of upright endogenous microbiota (yellow, blue, green and purple ovals, full line); (ii) hvKp (red oval, hypermucous) deploys many virulence factors. Type VI Secretion System (T6SS): to counteract the microbiota barrier; transporters of antimicrobial peptides and amino-acids (Sap, Tdc) and enzymes with lysine decarboxylase activity (Cad). Hypercapsular phenotype due to the presence of pLPVK plasmid (black circle) protects the pathogen against the host immune reaction. HvKp use the PI3k/Akt pathway to cross the epithelial barrier. (B) In intestinal dysbiotic mice: Dysbiosis (yellow, blue, green and purple ovals, dotted line) chemically induced (streptomycin, Dextran Sodium Sulfate (DSS), dithizone) or endogenous to immune-deficient murine models (*Il10<sup>-/-</sup>*, *T-bet<sup>-/-</sup>* *Rag2<sup>-/-</sup>* ulcerative colitis (TRUC)) allows the implantation of cKp. Gut colonization by *K. pneumoniae* associated with intestinal epithelium damage and dysbiosis enhanced the inflammatory state. Essential cKp colonization factors are related to capsule synthesis (*WcaJ*, red circle), metabolism advantage (urease, oxidase, and glutamate synthase) (blue diamond, blue and green cylinder), GI stress resistance (*EefA*, *TamA*, *OxyR*), (purple, yellow cylinder) and surface cell adhesion (Type 1 and 3 pili).

rate. There is however no clear consensus concerning the genetic background of mice (OF1, BALB/c, CD1, CFW1 and C57BL/6), and no difference in the dynamics of *K. pneumoniae* colonization between the various backgrounds.

Routinely, the murine model of intestinal colonization consists of an oral route of inoculation (gavage, and less frequently pipette feeding or administration of the pathogen in the drinking water) and subsequent determination of the intestinal colonization by CFU counting in the intestinal or fecal contents, and analysis of the immune host response (Table 1). Fecal shedding is currently used as a marker for gastrointestinal colonization by *K. pneumoniae* but an analysis of the different parts of the intestinal tract of mice that are orally contaminated showed an increasing gradient of colonization all along the intestine, with a preferential localization in the colon (Caballero et al., 2015). These approaches have highlighted the role of the local microbiota in *K. pneumoniae* implantation within the gut and characterized *Klebsiella* virulence and colonization factors.

#### 5.1.1. Colonization resistance of the intestinal microbiota to *K. pneumoniae*

Colonization resistance refers to the ability of the microbiota to prevent the expansion and persistence of exogenously acquired bacterial species (Buffie and Pamer, 2014). Such a mechanism has been described against the opportunistic pathogen *K. pneumoniae* (Fig. 38A) (Van der Waaij et al., 1971). Accordingly, the absence of intestinal microbiota in C57BL/6J germ-free (GF) mice results in higher levels of intestinal colonization by *K. pneumoniae* than those observed in conventional mice, and the introduction of a normal microbiota into *K. pneumoniae*-colonized mice results in the reduction and clearance of *K. pneumoniae* (Caballero et al., 2015; Lau et al., 2008). The induction of microbiota dysbiosis, by antibiotics or chemical agents, is thus necessary to obtain efficient colonization by classical *K. pneumoniae* of the murine intestine, unlike the establishment of hvKp, which does not require microbiota disruption (Fig. 38) (Favre-Bonté et al., 1999; Perez et al., 2011; Tu et al., 2009).

Oral administration of streptomycin, an antibiotic that targets commensal facultative anaerobes, is the gold standard to establish cKp intestinal colonization, with bacterial inoculums varying from  $10^5$  to  $10^8$  CFU (Coudeyras et al., 2008; Favre-Bonté et al., 1999; Hsieh et al., 2010; Jung et al., 2019; Khater et al., 2015; Maroncle et al., 2006; Struve and Krogfelt, 2003; Struve et al., 2008, 2009; Zhang et al., 2012). Miller and Bohnhoff observed that no *Bacteroides* were present in the feces of streptomycin-treated mice (Miller and Bohnhoff, 1963). Accordingly, the ability of gnotobiotic mice to resist gut colonization by *K. pneumoniae* has recently been reported to be due to the presence of Bacteroidetes phylum (Sequeira et al., 2020). Thus, *Bacteroides* disruption by highly-concentrated streptomycin treatment led to a “supershedder phenotype” with high levels of fecal colonization ( $10^8$

CFU/g feces) by *K. pneumoniae* strain KPPR1S (Young *et al.*, 2020). Constant streptomycin pressure is therefore necessary to maintain a stable and high colonization of cKp, from  $10^8$  to  $10^{10}$  CFU/g feces. Lagrafeuille *et al.*, showed that the colonization level of cKp was decreased by 3 log units in one week if streptomycin was given at only one time point 48h before inoculation (Lagrafeuille *et al.*, 2018). However, although *K. pneumoniae* becomes undetectable in the feces after initial colonization, it seems to persist at low levels in microniches in the colonic environment. Indeed, 15 days after CFU counts fell below the detection limit, administration of ampicillin induced a rise above the detection limit of *K. pneumoniae* CFU in mice feces (Schjorring *et al.*, 2008).

In 2003, Høyen *et al.* analysed the effect of the administration of different antibiotics on the gut colonization abilities of ESBL-producing *K. pneumoniae* in a murine model (Høyen *et al.*, 2003). The mice were intraperitoneally treated with either antibiotics targeting anaerobes such as clindamycin, piperacilin/tazobactam, ceftriaxone and ceftazidime, or antibiotics with a low effect on anaerobes such as cefepime, levofloxacin and aztreonam, and then orally inoculated with SHV ESBL-producing P62 strain ( $10^3$  CFU at day 0 and then  $10^8$  CFU at day 5).

Antibiotics with low effects on anaerobes did not influence *K. pneumoniae* intestinal colonization levels, whereas treatment with anaerobe-targeting antibiotics resulted in greater colonization levels (from  $10^5$  to  $10^7$  CFU/g feces) than treatment with saline buffer. Only clindamycin promoted stable and rapid colonization, up to  $10^9$  CFU/g feces at 3 days post-inoculation (Høyen *et al.*, 2003). In line with these results, Perez *et al.* showed that inhibition of anaerobes, especially *Bacteroides* species, by daily subcutaneous treatment with clindamycin allows maximal *K. pneumoniae* gut colonization levels (up to  $10^{10}$  CFU/g feces) (Perez *et al.*, 2011). More recently, the correlation between microbiota composition and *K. pneumoniae* gut colonization was assessed by a deep sequencing approach. Treatment with fidaxomicin, a molecule with a narrow-antimicrobial spectrum, poorly modulated the microbiota composition and achieved only low intestinal colonization ( $<10^4$  CFU/g feces) by *K. pneumoniae*. In contrast, administration of vancomycin, which inhibits *Firmicutes*, resulted in a greater level of colonization ( $10^6$  to  $10^{10}$  CFU/g of stool) (Deshpande *et al.*, 2016).

Dysbiosis, which is required to impair colonization resistance, can also be induced by other chemical treatments (Fig. 38B). For instance, the induction of intestinal dysbiosis by oral administration of 3% w/v Dextran Sodium Sulfate (DSS) results in a 3-log increase in *K. pneumoniae* colonization level in mice feces 3 days post-inoculation (Lau *et al.*, 2008). This high colonization level is however not linked to DSS-induced intestinal inflammation since no increase in colonization by *K. pneumoniae* was observed in a *Citrobacter rodentium* model that generates inflammation but not dysbiosis (Lau *et al.*, 2008).

The immune status of the host determines the pro-inflammatory levels of intestinal tissue in response to *K. pneumoniae* colonization. However, the precise role of each protagonist (host immune response, endogenous microbiota and *K. pneumoniae*) is hard to decipher owing to the complexity and diversity of the animal models used in the different studies (Fig. 38B). Genetically modified mice models have been used to go further in the investigation of host pathophysiology during intestinal colonization by *K. pneumoniae*. For instance, in *Il10<sup>-/-</sup>* mice with a low grade of intestinal inflammation, *K. pneumoniae* infant isolates potentiated inflammation and elicited colitis since fecal lipocalin-2 levels increased 1 month post-infection (Pope et al., 2019). Similarly, oral administration of salivary *K. pneumoniae* isolates potently induced colonic T<sub>H</sub>1 cells in the same model (Atarashi et al., 2017). The colitogenic properties of *K. pneumoniae* are also linked to the endogenous microbiota. The pro-inflammatory effects of *K. pneumoniae* were higher in mono-associated or naturally colonized mice than in mice colonized with a full complement microbiota (Pope et al., 2019). In addition, the *K. pneumoniae* strains recovered from feces of colitis-susceptible animals, *T-bet<sup>-/-</sup> Rag2<sup>-/-</sup>* ulcerative colitis (TRUC), were able to induce colitis in wild-type mice after oral administration, but only in presence of endogenous microbiota (Garrett et al., 2010). These observations provide evidence that commensal microbiota work in concert with *K. pneumoniae* and other intestinal pathobionts to cause intestinal inflammation.

The role of *K. pneumoniae* in the exacerbation of intestinal inflammation has also been reported in mice with intestinal microbiota disruption due to chemically-induced colitis. Administration of *K. pneumoniae* to new-born mice treated with dithizone, a molecule that induces Paneth cell ablation associated with microbiota dysbiosis, exacerbates intestinal inflammation, which leads to a necrotizing enterocolitis-like pathology (Lueschow et al., 2018; Zhang et al., 2012). The presence of colitogenic agents such as *K. pneumoniae* in gut microbial communities is thus necessary but not always sufficient to elicit intestinal inflammation in susceptible mice colitis models (either genetic or chemically-induced). The intrinsic capacities of the strains also seem to be important, but the specific associated inflammatory factors remain to be identified.

### 5.1.2. *K. pneumoniae* colonization factors

Implantation of cKp strains in the gut and their persistent colonization involve competition with commensal bacteria and a variety of stressors to survival including limitation of resources. Bacterial fitness in this complex environment is mediated by a multitude of pathogen-associated factors, usually referred to as colonization factors, that enable dense growth and persistence of the bacteria in the intestinal lumen.

Intestinal colonization models combined with the screening of *K. pneumoniae* transposon insertional mutant libraries (signature-tagged mutagenesis [STM] and multi-screening STM [MS-STM]), are powerful approaches that are able to identify the genetic factors involved in gut colonization. Mutants impaired in intestinal colonization were mainly affected in metabolic pathways, membrane transporter synthesis, DNA-metabolism, transcriptional regulation and unknown functions, and in lipopolysaccharides (LPS), phospholipids and fatty acid biosynthesis (Maroncle *et al.*, 2002; Struve and Kroghfelt, 2003). More recently, *K. pneumoniae* genes crucial for dense gut colonization were identified by the screening of a highly saturated transposon mutant library (<150,000 unique mutations) in antibiotic-treated mice orally inoculated with  $\sim 10^8$  CFU of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* ( $10^2$  to  $10^3$  CFU of each transposon mutant per inoculum). The bacterial content of fecal samples longitudinally collected for 4 weeks were sequenced by genome-wide transposon insertion sequencing (INseq) (Jung *et al.*, 2019). This approach identified genes that promote short- and long-term high-density colonization of the intestinal tract, including genes encoding for inner/outer membrane proteins, proteins involved in carbohydrate metabolism, DNA repair/metabolism, glutamate metabolism, and porphyrin metabolism. Some mutants with enhanced fitness were also identified with this methodological approach (Jung *et al.*, 2019). The creation of isogenic mutants and their testing in individual or competitive assays have confirmed the importance of the genes previously identified. For instance, Jung *et al.* confirmed dramatic defects related to gut colonization for  $\Delta tamA$  (transport system),  $\Delta gltB$  (glutamate synthase) and  $\Delta hemN$  (oxygen-independent oxidase) mutants in a 1:1 competition assay with the wild-type *K. pneumoniae* strain, whereas the  $\Delta fhIA$  (formate hydrogenlyase transcriptional activator) mutant colonized the animal gut better than the wild-type (Jung *et al.*, 2019). The screening of mutant libraries in colonization models emphasizes the importance of the diversity of the bacterial functions that play prominent roles in bacterial establishment inside the gut. In particular, several metabolic functions are primordial for bacterial colonization since they confer advantages to outcompete resident microorganisms with a similar metabolism (Fig. 38).

To validate the role of a bacterial function in intestinal colonization, the classical approach is to test the isogenic mutant of the encoding-gene in a colonization model, either individually or in competition with the wild-type parental strain. The phenotype of the mutants will then strongly depend on the experimental model, ie individual or competition testing. Mutants deficient in a factor required for competition in an ecological niche could be deficient when tested in a competitive assay but unaffected when tested individually. For instance, a cKp mutant defective in urease production ( $\Delta ureA$ ) showed no colonization defect when tested individually but was impaired in its colonization capacities when tested in competition with the wild-type strain (Maroncle *et al.*, 2006). However, authors rarely test mutants in both models in their experimental methodology. Hsieh *et al.* showed



that the *cad* and *tdc* operons, which confer adaptation of the hvKp NTUH-K2044 strain to bile salts and acidity, respectively, were involved in efficient intestinal colonization when mutants were tested in competition with the virulent wild-type strain. However, the phenotype of the mutants was not evaluated in an individual colonization assay (Hsieh *et al.*, 2010). Similarly, the tripartite efflux pump EefABC conferred a competitive advantage to cKp for intestinal colonization, but its role was not analysed in an individual colonization assay. Growth experiments in presence of different stresses showed that this efflux system confers acid tolerance to bacteria in response to inorganic acid (eg chlorhydric acid), a condition encountered inside the intestinal tract (Coudeyras *et al.*, 2008).

Some other colonization factors contribute not only to competition with microbiota, but also to bacterial establishment and multiplication in the intestine (Fig. 38). Thus, mutants deficient in these functions are deficient in both individual and competitive assays. For instance, the role of capsular polysaccharides (CPS) in intestinal colonization was described in both individual and competitive assays by Young *et al.* (Young *et al.*, 2020). The capsule-deficient mutants  $\Delta manC$  and  $\Delta wcaJ$  colonized poorly over the course of 15 days in individual colonization assays, and the  $\Delta manC$  mutant presented a negative competitive index ( $\Delta manC/WT$ ) in co-infection with the wild-type strain (Young *et al.*, 2020). The role of *K. pneumoniae* capsule in establishing robust gastrointestinal colonization was also observed by Favre-Bonté *et al.* in both individual and competitive assays with the wild-type strain (Favre-Bonté *et al.*, 1999). In their study, a cKp capsule-deficient mutant colonized at lower levels ( $10^4$  CFU/g feces) than the wild-type strain, which persisted in the intestinal tract at high levels ( $10^8$  CFU/g feces), and *in situ* hybridization with fluorescence-labelled oligonucleotide probes on mice colonic section showed that the mutant formed clusters in the mucus layers whereas the wild-type strain remained dispersed (Favre-Bonté *et al.*, 1999). The role of certain fimbriae that are assembled by the chaperone-usher (CU) pathway has also been assessed in both individual and competition models. An *in silico* predictive approach identified two novel CU systems encoded by *kpj* and *kpg* loci in cKp LM21. The deletion of the usher-encoding gene in these two operons significantly impaired intestinal tract colonization in a co-colonization assay with the wild-type strain. However, only the mutant deficient in the usher of the putative Kpj structure was tested in individual colonization assays, in which it also presented a colonization defect (Khater *et al.*, 2015). In a more recent study using INSeq, the deletion of *kpjC*, which encodes the usher protein in the *kpj* operon, did not however significantly alter the intestinal colonization of the *K. pneumoniae* carbapenem-resistant (CR-Kp) ST258 strain in a competitive assay (Jung *et al.*, 2019). The role of type 1 and type 3 pili have been mainly studied in murine intestinal competition assays by co-infecting a deficient mutant and the wild-type parental strain. Although the role of type 3 pili in efficient colonization is well established, studies are at variance

concerning the role of type 1 pili (van Aartsen et al., 2012; Jung et al., 2019; Khater et al., 2015; Struve et al., 2008).

Bacteria can form multicellular biofilm-like communities in the gastro-intestinal tract and therefore co-infection with a wild-type strain and a mutant deficient in individual colonization assays could form a mixed population (intraspecies) in the intestine, which would help compensate for the deficiency of the mutant strain. However, to our knowledge, no study has described this phenomenon. Several bacterial factors have been identified in individual colonization assays but their role in a competitive context has not been assessed. For instance, a *K. pneumoniae oxyR* mutant was drastically affected in an individual murine intestinal colonization assay after orogastric inoculation but its phenotype was not determined in a competitive assay (Hennequin and Forestier, 2009b). The transcriptional factor OxyR, a member of the LysR regulator family, is commonly associated with the detection of elevated levels of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide and the subsequent regulation of the expression of antioxidant genes that protect the bacterial cells from being killed. OxyR is also involved in the regulation of several phenotypes classically associated with the process of gastrointestinal colonization, such as biofilm formation, fimbrial synthesis, motility, and resistance to intestinal stresses (Chung et al., 2016; Honma et al., 2009; Johnson et al., 2006).

The use of animal models allows a better understanding of the molecular mechanisms involved during gastrointestinal tract colonization by *K. pneumoniae*. The behavior of *Klebsiella* inside the intestine flora and its interactions with the other members of the microbiota are poorly documented however and further elucidation would require the development of gnotobiotic models with controlled microbiota. Finally, although it is assumed that the intestinal colonization precedes infection of secondary sites, the precise pathophysiology of *Klebsiella* infections is still unclear.

## 5.2. Systemic infections

Extraintestinal infections involving bacteria from the intestinal microbiota result from both exogenous and endogenous contamination. Unlike cKp, hvKp strains are able to disseminate in immunocompetent patients, which increases the risk of community-acquired infections. Different murine models have been developed to assess the pathophysiology of extra-intestinal infections and their associated mortality (Table 1). Oral inoculation of the pathogen, by mimicking the natural route of *K. pneumoniae* infection, makes it possible to study the phenomenon of bacterial translocation. However, extra-intestinal inoculations (ie subcutaneous, intraperitoneal or intravenous) are usually performed to assess systemic bacterial fitness. While no clear consensus has been established regarding the genetic background of mice used in experimental models (eg BALB/c, C57Bl/6, ICR, Swiss Webster), the BALB/c line is the most often used (Diago-Navarro et al., 2017; Krapp et al., 2017; Tu et

*al.*, 2009; Wu *et al.*, 2008). Genetic-impaired models are also used to investigate the behavior of hvKp strains in immunocompromised mice.

### 5.2.1. Spreading from the intestinal tract

Orogastric inoculation of the pathogen is a useful way to investigate the spatial and temporal kinetics of hvKp *K. pneumoniae* infection such as the ability of bacteria to cross the epithelial barrier (Fig. 38A) and to induce extraintestinal infections, particularly in the blood, spleen and liver. Although intestinal translocation is not clearly established for cKp strains, oral gavages of BALB/c mice with  $10^7$  CFU of hvKp CG43 induced, as early as 24h post-inoculation, colonization of the spleen with 3 to 4 log CFU/g, and subsequent dissemination to the liver, blood and kidneys at 36h, 48h and 72h post-inoculation, respectively (Tu *et al.*, 2009). Four stages of hvKp strain infection have thus been determined: i) intestinal colonization rapidly followed by ii) extraintestinal dissemination, iii) hepatic replication and iv) sepsis (Tu *et al.*, 2009). Each of these infection steps is governed by specific bacterial factors, especially those encoded by the virulence plasmid of hvKp strains since the hvKp CG43 pLVPK-cured strain is attenuated in dissemination from the gastrointestinal tract to systemic circulation and to extraintestinal organs compared to the parental wild-type strain (Tang *et al.*, 2010).

After oral inoculation of the CG43 hvKp strain ( $10^7$  CFU) in C57BL/6 mice, 28 STM mutants (impaired in cell metabolism, surface components and transporters, and regulation functions) that attenuated liver and spleen dissemination were identified. Of these, 8 avirulent mutants specifically affected in epithelial barrier translocation were identified: they did not cause mouse mortality but their virulence was restored when inoculated intraperitoneally (Tu *et al.*, 2009). Factors essential for the translocation process are associated with type III fimbriae assembly, uracil permease synthesis and quorum-sensing. The molecular mechanisms of intestinal barrier translocation remain incompletely defined but could involve the PI3K/Akt dependent pathway (Hsu *et al.*, 2015). The same group identified the Sap complex as being involved in dissemination process from the intestine after oral inoculation of hvKp Ca0437. Sap transporter, an inner membrane complex conferring resistance to antimicrobial peptides in *Salmonella*, is associated with extraintestinal bacterial dissemination to the spleen and liver. A  $\Delta sapA$  mutant has a 3-fold reduced bacterial load in the liver and spleen 72h after oral inoculation compared to the Ca0437 wild-type strain. This attenuated phenotype was shown to be associated with a lower histological pathology score in the liver and colon of  $\Delta sapA$ -inoculated mice than in those inoculated with the wild-type strain (Hsu *et al.*, 2019). The type VI secretion system (T6SS), a molecular syringe with bactericidal activity harbored by certain pathogens, is also involved in hvKp virulence since it allows microbiota-encountered resistance during the colonization process to be bypassed (Sana *et al.*, 2016). Hsieh *et al.* identified a T6SS in the hypervirulent NTUH-K2044 strain that

is critical for successful intestinal colonization and extraintestinal dissemination. In mice inoculated with both the wild-type NTUH-K2044 strain and its T6SS deletion mutant (ratio 1:1), the mutant was detected at much lower levels than the wild-type strain in the intestine, liver and spleen (competitive index of 0.123, 0.197 and 0.118, respectively) 7 days post-inoculation (Hsieh et al., 2019). Intra-gastric inoculation can reproduce the first steps of the natural *K. pneumoniae* infectious route but does not allow identification of factors specifically involved in extraintestinal dissemination.

### 5.2.2. Spreading from extraintestinal sites

Systemic inoculation of hvKp in mice is performed intravenously, subcutaneously or intraperitoneally in order to bypass the gastrointestinal barrier. Such approaches have allowed the identification of specific hvKp-associated virulence factors in *in vivo* murine models.

As an essential component, the pLVPK plasmid, which carries inter alia, the *rmpA* and *magA* virulence genes, is largely responsible for the hypervirulent phenotype in hvKp. The presence of *rmpA* (a regulator of the mucoid phenotype) and *magA* (mucoviscosity-associated gene A) genes on pLVPK plasmid confers to hvKp a hypermucous phenotype (Chen et al., 2004; Fang et al., 2004). The loss of RmpA and/or RmpA2 is associated with decreased capsule production, potentially making RmpA/RmpA2 to be critical factors for increased virulence of hvKp strains compared to cKp strains (Russo and Marr, 2019). However, whereas prevalence studies showed an association of *rmpA* with infection severity in mice its role in *K. pneumoniae* virulence remains unclear. Deletion of the plasmid-born *rmpA* gene in the hvKp NTUH-K2044 strain does not significantly reduce the virulence of *K. pneumoniae* in mice, either in mice survival assays or in *in vivo* competition assays after intraperitoneal inoculation (Hsu et al., 2011). MagA (renamed Wzy<sub>KpK1</sub>) is a capsular polysaccharide polymerase specific to serotype K1 (Fang et al., 2004; Yeh et al., 2010).  $\Delta magA$  mutants lose their mucoviscosity, become susceptible to neutrophil phagocytosis and are not lethal to mice (Fang et al., 2004; Yeh et al., 2010). Likewise, an unencapsulated  $\Delta wcaJ$  mutant deficient in the WcaJ glycosyltransferase involved in the initial steps of capsule production is impaired in its ability to disseminate into the liver, lungs and spleen of intraperitoneally infected mice in comparison to the parental strain (Tan et al., 2020). After intraperitoneal inoculation in mice, the serine protease *hrtA* mutant in a hvKp strain, abrogated in capsule production, had a 500-fold greater LD<sub>50</sub> than the WT strain thereby evidencing the primordial role of the capsule of *K. pneumoniae* in the infection process (Cortés et al., 2002a).

*In vivo* models have also been used to investigate the role of capsular polysaccharide composition in virulence. Pan et al. showed that intravenous inoculation of a KpL1 hvKp mutant deficient in *gmd*, a gene responsible for fucose synthesis, induces a mortality rate among mice of only 5% within 14 days compared to full mortality with the wild-type strain (Pan et al., 2011). One

explanation would be that the fucose-rich capsular serotype of virulent strains has less affinity for murine macrophages than the avirulent capsular-serotype strain (Kabha et al., 1995). Fucose-poor and mannose-rich capsules of classical KpU1 strains are highly adherent to mouse-isolated peritoneal macrophages in contrast to fucose-rich and mannose-poor capsules of hvKp KpL1 strains, suggesting that a fucose-containing capsule has the advantage of bypassing the host defences (Wu et al., 2008). Additionally, a KpL1 *gmd* mutant had greater adherence to pre-recruited mouse peritoneal macrophages than its parental strain and was unable to disseminate via systemic circulation (Pan et al., 2011). The large amount of mannose in cKp capsules would thus explain the tropism for phagocytes and the greater clearance of cKp from the host compared to hvKp. In accordance, strains of *K. pneumoniae* expressing Man- $\alpha$ 2/3-Man or Rha- $\alpha$ 2/3-Rha sequences in their capsule could be effectively recognized by macrophage mannose receptors and ingested by macrophages, although hvKp K1 and K2 serotype strains that lack Man- $\alpha$ 2/3-Man or Rha- $\alpha$ 2/3-Rha in their capsule would thus not be recognized by the macrophage lectins (Athamna et al., 1991; Keisari et al., 1997). In hvKp strains, capsular polysaccharides are thus essential virulence factors since they avoid, by their composition, recognition by macrophages. Thus, intraperitoneal injections in BALB/c mice showed that K1 and K2 capsular serotype strains were highly virulent whereas the uncapsulated  $\Delta$ K1 mutant ( $\Delta$ *rfbP*) had substantially attenuated virulence similar to that of the cKp K62 strain. Serotypes K1 and K2 had greater phagocytic resistance to neutrophils than K62 and the  $\Delta$ K1 mutants and the determination of CFU in organs showed that mice lethality is linked to the inability to clear bacteria (Fung et al., 2011). Time-dependent increases in cytokines and chemokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, KC and MIP-2) in the serum and liver were observed only in hvKp K1- and K2-infected mice in contrast to inoculations of K62 and  $\Delta$ K1, which did not result in similar strong immune responses (Fung et al., 2011).

Other surface structures, like lipopolysaccharides, play a role in the expression of hvKp virulence *in vivo*. For instance, in a mice intraperitoneal infection model, hvKp *wbbO* mutants (NTUH-K2044 and NTUH-A4528 backgrounds) impaired in a galactosyltransferase that is required for serotype O1 were poor colonizers of mouse organs (ie liver, spleen and blood) and induced a lower lethality rate than the wild-type strain (Hsieh et al., 2012). Membrane lipoproteins Pal, LppA and YfgIL are also involved in the virulence, dissemination, and induction of inflammation: mice intraperitoneally infected with deficient mutants had a better viability, as measured by the determination of the LD50 or 28-day survival rate, had a lower bacterial dissemination and a lower IL-6 production in the liver and spleen than the mice infected with the parental wild-type strain (Hsieh et al., 2013, 2016).

Production of siderophores also confers to *K. pneumoniae* a selective advantage for virulence in *in vivo* systemic infection models. Quantitative analysis of siderophores has demonstrated that hvKp strains produce more siderophores than cKp strains and that this trait enhances hvKp virulence since

a high siderophore concentration was strongly predictive of a hvKp isolate and increased lethality in a mouse systemic infection model (Russo et al., 2018). HvKp strains have the ability to produce four different siderophores: enterobactin (Ent), yersiniabactin (Ybt), salmochelin (Sal), and aerobactin (Aer), but only Sal and Aer are specific to hvKp. The *iro* and *iuc* operons, responsible for Aer synthesis, are carried by the virulent pLVPK plasmid in the hvKp strains (Kislichkina et al., 2017). Aerobactin accounts for the overwhelming majority of increased siderophore production in hvKp, independently of the gene copy number. The role of each siderophore in virulence has been evaluated in pulmonary, subcutaneous and intraperitoneal infection models by measuring the mortality of outbred CD1 mice after subcutaneous challenge with HvKp1 mutants deficient for one or more siderophores. Of all the mutants tested, only the HvKp1 isogenic Aer ( $\Delta iucA$ ) mutant showed attenuated virulence in all models (Russo et al., 2014, 2015). The role of aerobactin in virulence is however lower than that of the capsular polysaccharides. K1 and K2 strains were highly virulent in BALB/c mice after intraperitoneal injections whereas the uncapsulated  $\Delta K1$  mutant ( $\Delta rfbP$ ), while still harboring the Aer encoding gene, had substantially attenuated virulence, similar to that of the cKp K62 strain (Fung et al., 2011). Fulfilling Koch's postulate, the combined effects of overproduction of virulence factors and a high degree of phagocytosis resistance seem to be very useful in the dissemination of hvKp. Interactions with host immunity are largely related to capsule polysaccharides and to the virulence of the strains (e.g. cKp or hvKp) which is dependant of the bacterial accessory genome (Fung et al., 2011; Gonzalez-Ferrer et al., 2021).

By mimicking host pathology-engendered susceptibility, immunocompromised *in vivo* models greatly contribute to understanding the pathophysiology of *K. pneumoniae* systemic infections. hvKp strains cause skin and tissue infections in immunocompromised patients which can be reproduced in neutropenic mice treated with anti-Ly6G antibody (Krapp et al., 2017; Shon et al., 2013). Interestingly, in this model some CR-Kp strains are as virulent as a hvKp strain in their ability to form subcutaneous abscesses and to disseminate to the liver. Intravenous infection of immunocompromised diabetic mice with the low virulent cKp (KpU1 UTI strain) results in more severe lethality than in non-diabetic mice. Similarly, a hvKp strain isolated from liver abscess had greater virulence in diabetic than in nondiabetic mice (Wu and Tsai, 2005). In the same study, intravenous infection with hvKp significantly decreased the blood TNF- $\alpha$  level in diabetes mellitus mice whereas the IL-1 $\beta$  level tended to increase in the blood of both infected nondiabetic and diabetic groups (Wu and Tsai, 2005). Another study using diabetic mice treated with streptozotocin, which ensures the death of pancreatic  $\beta$ -cells, evidenced the ability of cKp and hvKp to translocate into the liver via Kuppffer cell activation. In this model, diabetes mellitus causes enteric dysbiosis, which leads to the production of nitric oxide and subsequent stimulation of Kuppffer cells (Lin et al., 2017). Interestingly, IFN- $\gamma$  KO mice intravenously infected with the hvKp 43816

strain were no more susceptible than their wild-type counterparts. Overproduction of liver cytokine IL-10 in IFN- $\gamma$  KO mice 2 days post-infection compared to production in wild-type mice (35 ng/mL vs below detection limit, respectively) could explain the underlying response (Moore et al., 2002). However, other studies showed that inhibition of IL-10 activity using anti-IL-10 antibody tends to enhance mice survival after intraperitoneal or intratracheal inoculations of *K. pneumoniae* (Greenberger et al., 1995; Wang et al., 1999). The role of the IL-10 cytokine can vary significantly depending on the site of infection (Moore et al., 2002).

Systemic infection models can be used to investigate dissemination of the pathogen and its colonization of extraintestinal organs while avoiding the epithelial barrier translocation process. Since the prevalence of cKp strains in severe disseminated infections is low most studies use K1 or K2 hvKp strains with high infectious doses. However, cKp strains can cause community-acquired infections in susceptible hosts with comorbidities who are immunocompromised or who have existing barrier breakdown. Thus, the development of animal models mimicking susceptible hosts will be a significant contribution to understanding the pathophysiology of these infections.

### 5.3. Pulmonary infections

*K. pneumoniae* has been historically recognized as a common respiratory pathogen since its discovery in 1882, and is involved in both community-acquired pneumonia (CAP) and hospital-acquired pneumonia (HAP) (Ko, 2002; Paczosa and Meccas, 2016). CAPs caused by *K. pneumoniae* are rare in Europe and North America but account for 15% of total cases of CAP in Asia and South Africa, mainly due to the increasing prevalence of hvKp strains (Jones, 2010; Ko, 2002; Rammaert et al., 2012; Rello et al., 1996; Song et al., 2008). Medical ventilators are a major risk factor in HAPs caused by *K. pneumoniae* because they provide the pathogen a surface on which to colonize and form biofilms (Jones, 2010; Percival et al., 2015).

#### 5.3.1. *In vivo* models

To assess host-pathogen interactions during *K. pneumoniae* pulmonary infections, several *in vivo* models have been developed including non-mammalian models (Bengoechea and Sa Pessoa, 2019) (Table 1). However, murine models are the most widely used because they are easy to handle and because there is a significant similarity in the infectious process of murine and human pneumonia (Mizgerd and Skerrett, 2008). The first model was developed in 1947 and consisted of intratracheal inoculation of bacteria in rats to evaluate antibiotic treatments (Sale and Wood, 1947; Sale et al., 1947). Since then, several models of pneumonia have been used mostly based on two methods of inoculation.

The first method is direct instillation of bacteria in the lower respiratory tract. It requires general anesthesia, either by endotracheal injection or oropharyngeal inoculation. For endotracheal injection, the trachea is exposed by surgery and a volume of 10  $\mu$ L to 50  $\mu$ L of bacterial suspension is injected before closure of the incision (Broug-Holub *et al.*, 1997; Deng *et al.*, 2004; Domenico *et al.*, 1982; Lau *et al.*, 2007; Rosen *et al.*, 2016, 2017). This method can lead to inflammation of the area, especially of the surgical wound, that potentially affects the global immune response measured at the endpoint of the experiment. For oropharyngeal inoculation, animals are placed in a semi-vertical position and a volume of 10  $\mu$ L to 50  $\mu$ L is injected with a blunt-tipped needle either at the tracheal entrance or directly into the bronchi (Bachman *et al.*, 2015; Cortés *et al.*, 2002b; Holden *et al.*, 2016; Padilla *et al.*, 2010; Russo *et al.*, 2015; Sale and Wood, 1947; Sale *et al.*, 1947; Willsey *et al.*, 2018). These techniques allow the administration of a precise bacterial inoculum into the lungs, which results in good reproducibility of infection (Bielen *et al.*, 2017; Mizgerd and Skerrett, 2008). Both methods are tricky and can cause unilateral infection of the left lung and consequently a disparity in effects of infection on animals (Domenico *et al.*, 1982).

The second popular method used to induce pneumonia is the inoculation of bacteria in the upper respiratory tract by intranasal instillation. The animals are held in a semi-vertical position, after brief anesthesia, and droplets of the bacterial inoculum are deposited onto the nares, allowing contamination of the lungs by aspiration during breathing. The volume of the inoculum is generally around 20  $\mu$ L, administered sequentially by aliquots of 5 to 10  $\mu$ L (Guilhen *et al.*, 2019; Lawlor *et al.*, 2005, 2006; Lou *et al.*, 2018; Palacios *et al.*, 2017, 2018; Varelle-Delarbre *et al.*, 2019). Intranasal instillation is less invasive than instillation in the lower respiratory tract but the dose of bacteria that reaches the lungs is difficult to control (Mizgerd and Skerrett, 2008). The inoculum can (i) be expelled from the nares during expiration, (ii) be diverted to the alimentary tract or (iii) stay in the upper respiratory tract, leading to a high variability of infection.

There is no consensus on the bacterial inoculum load in the overall experiments performed with murine pulmonary models. However, it should be noted that inoculation in the lower respiratory tract requires a lower dose than intranasal inoculation. Bacterial inoculum varies from  $10^3$  to  $10^9$  CFU, depending on the virulence of the strain (hvKp or cKp) and the susceptibility of the mice (Holden *et al.*, 2016; Lau *et al.*, 2007; Lawlor *et al.*, 2007; Lou *et al.*, 2018). Although there is no consensus on the mice background used to mimic pulmonary infection, C57BL/6 mice are the most commonly chosen. However, studies on host physiology are more likely to use BALB/c, 129, CBA or C3H backgrounds. In addition, genetically modified mice whose production of immunological markers is impaired are often used to characterize the host responses to bacterial pulmonary infection.



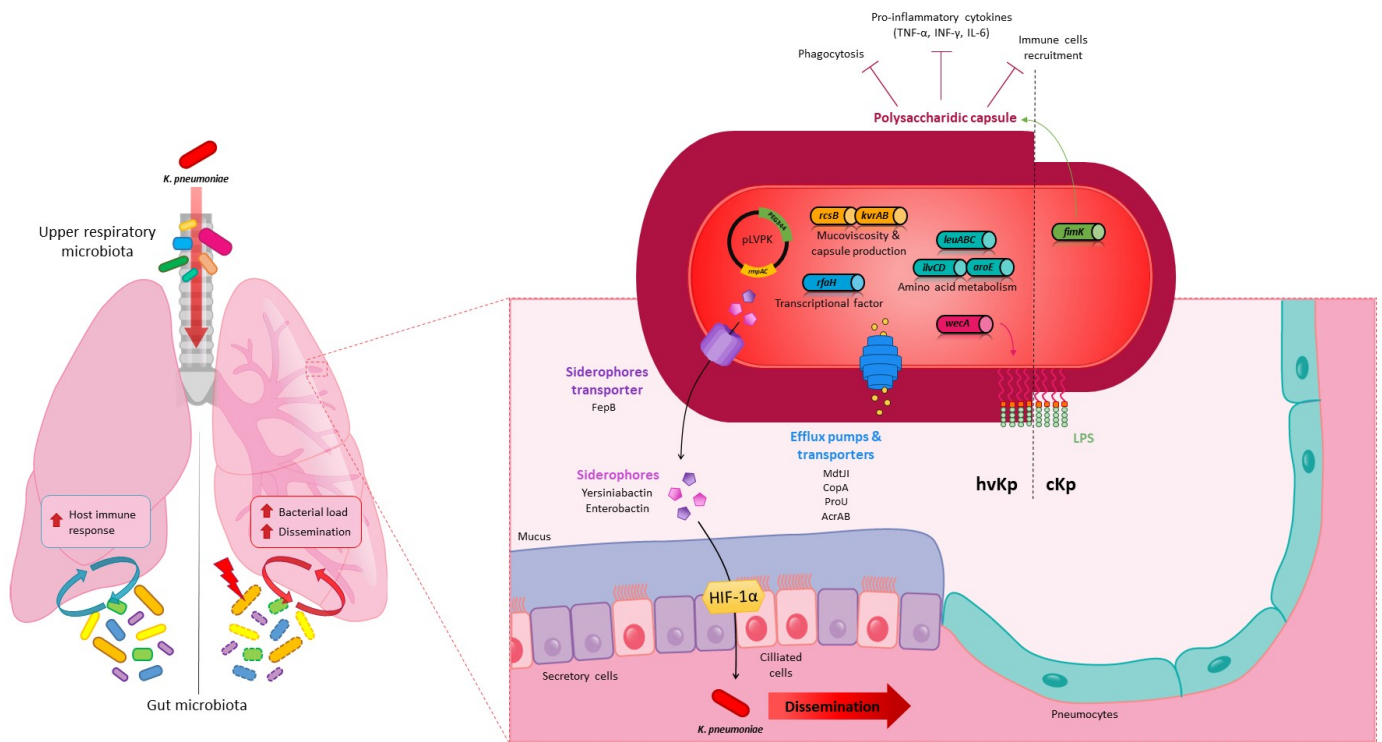


Figure 39 : *K. pneumoniae* in the lungs in an *in vivo* murine model. Local (respiratory) and distal (gut) microbiota (yellow, blue, green, and purple ovals) can modulate the host immune response to *K. pneumoniae* (red oval) lung infection and *K. pneumoniae* pathogenicity unlike dysbiotic gut microbiota (yellow, blue, green, and purple ovals, dotted line). Virulence factors involved in lung colonization by classic (cKp, right side) or hypervirulent (hvKp, left side) *K. pneumoniae* strains: **Capsule**, overproduced in hvKp and finely regulated by many pathways (FimK, RcsB, KvrA, KvrB, RmpA, RmpC); **Lipopolysaccharide (LPS)**, which depends on the *wzcA* gene for the initiation of biosynthesis; **Membrane proteins** such as transporters and efflux pumps (MdtII, CopA, ProU and AcrAB); **Siderophores** enterobactin (Ent) and yersiniabactin (Ybt) and FepB siderophore transporters are present in cKp, but their role in virulence and dissemination through the lung epithelial barrier via hypoxia inducible factor-1α (HIF-1 α) stabilization was only characterized for the hvKp strains; **Critical fitness genes** involved in the synthesis of essential branched chain and aromatic amino acids (*leuABC*, *ilvCD* and *aroE*) and RfaH transcriptional factor.

The classical method to evaluate the role of bacterial factors in the establishment of pneumonia and the impact of host immunity or treatments on disease outcome is to determine the bacterial burden in the lungs and other tissues by standard quantitative culture. Determination of the bacterial load is sometimes supplemented by other approaches such as survival rate, histological studies of lung tissues, or host immune response analysis in the tissues and the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) (Table 1). Another alternative, which is highly sensitive and non-invasive, is the quantification of bioluminescence emitted by a pathogen genetically modified to express the bioluminescence-encoding genes (*lux* operon). This technique, infrequently used with *K. pneumoniae* lung infection models, is a useful tool to monitor bacterial burden and analyse the kinetics of spreading, and in parallel, to contribute to reducing animal numbers in accordance with ethical regulations.

### 5.3.2. *K. pneumoniae* pulmonary virulence factors

Lung infection models in mice were used to characterise *K. pneumoniae* virulence factors (Fig. 39) and tropism without any rationale concerning the choice of the inoculation methods which seemed to depend mainly on routine laboratory practices. The polysaccharide capsule was one of the first and most described virulence factors in *in vivo* pneumonia models and is essential to establish pulmonary infection despite local immune pressure (Chhibber et al., 2003; Cortés et al., 2002b; Domenico et al., 1982; Yoshida et al., 2000). Deletion of the capsule in *K. pneumoniae* impairs its growth and survival in the lungs and aborts its ability to cause severe pulmonary infection and animal death in both intranasal and intrapulmonary *in vivo* models (Chhibber et al., 2003; Cortés et al., 2002b; Lawlor et al., 2005; Yoshida et al., 2000). In addition to protecting against phagocytosis, the capsule reduces host inflammatory response by shielding the LPS O-antigen from innate immunity recognition, thus limiting immune cell recruitment in BALF and the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-6) in early and late stages of infection in the intranasal model (Lawlor et al., 2006; Yoshida et al., 2000, 2001). Capsule production is transcriptionally regulated by a number of proteins that are associated with bacterial virulence in the lungs (Paczosa and Meccas, 2016). For instance, a mutant deficient in FimK, a pilus regulator involved in capsule production, produces significantly less capsule than the wild type strain and is attenuated in virulence in murine intrapulmonary models compared to the parental strain, suggesting that the capsule protects bacteria from the host immune response in the lungs (Rosen et al., 2016). More recently, Zhang et al. used a intrapulmonary *in vivo* model to identify AmpR, a regulator of the WcaJ enzyme that initiates capsule synthesis, as essential for the virulence of both hypermucoviscous and non-hypermucoviscous *K. pneumoniae* strains (Zhang et al., 2020). In addition,  $\Delta rcsB$  and  $\Delta rmpA$  mutant strains had lung colonization levels about 4-log lower than that of the parental strain KPPR1S at 24 hours post-infection in a mice intranasal model of pneumonia,

and a  $\Delta rmpC$  strain was also attenuated by nearly 2 logs (Walker *et al.*, 2019). Unlike  $\Delta rmpA$  and  $\Delta rcsB$ , the  $\Delta rmpC$  mutants retain the hypermucoviscous phenotype, supporting the notion that this phenotype is not simply due to overproduction of capsular polysaccharides and is not directly associated with virulence (Walker *et al.*, 2019). Expression of *rmpA* modulates capsule production under the control of the RcsB, KvrA, and KvrB regulators. Their deletion in hvKp strains decreased bacterial virulence in a mouse intranasal model of pneumonia (Palacios *et al.*, 2018). With the cKp strain, the deletion of *kvrA* also affected virulence but had no effect on capsule gene expression or capsule-related phenotypes, suggesting that the effect of KvrA on virulence is not exclusively mediated by capsule production (Palacios *et al.*, 2018).

Many other bacterial factors involved in fitness during lung infection have been identified with global approaches in both *in vivo* models of pneumonia (intranasal and intrapulmonary infections). In 2007, Lau *et al.* used a PCR-based suppressive subtractive hybridization approach in an intrapulmonary mice model to compare two strains that differed significantly in their ability to cause disease, the classic IA565 and the hypervirulent KPPR1 strains (Lau *et al.*, 2007). In this model, the functions essential for causing pneumonia were related to the regulation of iron uptake, fimbrial-mediated adhesion, energy production and conversion, transcriptional regulation, signal transduction, restriction of endonuclease activity, and membrane transport (Lau *et al.*, 2007). In 2015, Bachman *et al.* performed screening of a KPPR1 *K. pneumoniae* transposon library after intrapulmonary inoculation combined with high-throughput sequencing similar to that used by Jung *et al.* to identify factors involved in intestinal colonization by the ST258 strain (Bachman *et al.*, 2015; Jung *et al.*, 2019). The determination of the relative fitness of each mutant 24 h post-inoculation was based on the ratio of lung to inoculum read counts and the concordance in location of transposon insertions. Over 300 mutants with at least a 2-fold fitness defect in inducing lung infection and 69 with defects ranging from 10- to >2,000-fold were identified. To validate the statistical approach using the CEDER *P* value as an efficient criterion to identify true-positive fitness genes in the lung, six isogenic mutants were constructed. Their subsequent individual analysis in an *in vivo* intrapulmonary model confirmed their fitness defect in the lung infection compared to the wild-type strain. Critical fitness genes included *rfaH*, which encodes a transcriptional factor involved in the transcription of several genes associated with virulence such as those involved in capsule and LPS production, those responsible for the synthesis of essential branched-chain and aromatic amino acids (*aroE*, *ilvC* and *ilvD*), and *copA*, which encodes a copper efflux pump required to prevent copper toxicity (Bachman *et al.*, 2015). Another screening in an *in vivo* intranasal murine model with a global STM approach identified 106 mutants of the hvKp KPPR1 strain that failed to either colonize the lungs or disseminate to the spleen. The first gene of the “enterobacterial common antigen” (ECA) synthesis locus, which encodes the WecA

enzyme, appears to be detrimental as it is required for spleen dissemination upon lung infection. Although WecA is involved in both ECA and LPS production, the attenuation in virulence in the lungs of *wecA* mutants is the result of defects in LPS rather than ECA deficiency (Lawlor et al., 2005). Willsey et al. identified other virulence factors involved in bacterial survival in the lungs by analyzing the *in vitro* transcriptional response of *K. pneumoniae* strain MGH78578 to purified pulmonary surfactant, a phospholipid-rich mixture coating the alveolar surfaces that has a role in the reduction of surface tension and host immunity modulation. The behaviour of isogenic KPPR1 deletion mutants in surfactant-induced genes was further investigated in an intrapulmonary murine model of pneumonia. The study showed the importance of the MdtII polyamine efflux pump and the ProU glycine betaine ABC transporter in pulmonary infection, and also of the previously identified *leuABC* operon involved in branched-chain amino acid synthesis (Willsey et al., 2018). The involvement of other potential inner membrane transporters essential for hvKp in *in vivo* intrapulmonary models of infection such as the AcrAB efflux pump and PEG344 has also been reported (Bulger et al., 2017; Padilla et al., 2010). More recently, Paczosa et al. characterized *K. pneumoniae* virulence factors required to cause pneumonia in intranasally inoculated immunocompromised mice using high-throughput screening of a transposon insertion mutant library (Paczosa et al., 2020). They identified genes that promote the survival or growth of bacteria in the lungs in the presence of polymorphonuclear cells (PMNs), including genes responsible for mucoviscosity phenotypes (*dsbC*, *wzm-wzt* and *ycgE*), and in ROS- or reactive nitrogen species (RNS)-resistant (*dedA*, *gntR*, *yaaA* and *ycgE*) (Paczosa et al., 2020).

*In vivo* intranasal and intrapulmonary murine models of pneumonia have also showed that certain siderophores (enterobactin, yersiniabactin, salmochelin, and aerobactin) are major virulence factors of hvKp, influencing pulmonary infections (Holden et al., 2016; Lawlor et al., 2007; Russo et al., 2015) (Fig. 39). Mutants attenuated in the import or export of siderophores also have limited virulence. For example, a *fepB* mutant, unable to process enterobactin and enterocholin through the periplasm, showed attenuation of bacterial burden in the lungs and was unable to disseminate to the spleen (Palacios et al., 2017). In addition to promoting bacterial survival and growth in the lung environment through their iron-chelating activities, siderophores secreted by *K. pneumoniae* in intrapulmonary murine model contribute to activating host stress responses by the induction of IL-6, CXCL1 and CXCL2 production and stabilization of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), the master transcription factor. Secretions within the lungs of pro-inflammatory cytokines (IL-6, CXCL1, and CXCL2) are necessary to protect the host from *K. pneumoniae*. In contrast, siderophore-dependent stabilization of HIF-1 $\alpha$  has the opposite effect since it promotes bacterial dissemination from the lungs to the spleen. Although the mechanism involved in this systemic spread is unknown, HIF-1 $\alpha$  is a global transcriptional factor that can control vascular permeability or induce disruption of the epithelial barrier (Holden et al.,

2016). These data are consistent with those of a study published by Lawlor *et al.*, who showed in a murine pulmonary model that *K. pneumoniae* mutants deficient in Ent and Ybt production inoculated intranasally in mice are significantly prevented from disseminating to the spleen after 96 h of infection (Lawlor *et al.*, 2007). Enterobactin, which is present in most *K. pneumoniae* isolates, is counteracted in the lungs by host innate immunity protein lipocalin-2 (Lcn-2), which by a process of iron sequestration limits the acquisition of iron by bacteria. The production of alternative siderophores (Ybt or glycosylated Ent [called salmochelin]) thus allows *K. pneumoniae* to avoid the action of Lcn-2 and bacterial growth in perivascular spaces, and the resulting systemic dissemination (Bachman *et al.*, 2011, 2012). A subsequent study showed in an intrapulmonary murine model of pneumonia that Ybt is likely to confer on bacteria limited potential to disseminate and cause blood infection compared to Ent. Indeed, Ybt activity is limited by transferrin, another host iron-binding protein that is present in perivascular spaces (Bachman *et al.*, 2012). In contrast to all these findings, Russo *et al.* showed in an intrapulmonary murine model that aerobactin, unlike other siderophores, plays a predominant role during pulmonary infection, contrary to Ent, Ybt and Sal. These conflicting results could be due to differences in the overall production of siderophores among the hvKp strains (Russo *et al.*, 2015).

Both intranasal and intrapulmonary inoculation methods contribute to obtaining an extended list of bacterial factors required for efficient infection of the lungs. The comparison of these technical approaches is still difficult as the use of both methods in a single study occurs rarely. However, the choice of inoculation mode seems to be important in investigation of the host response and airway microbiota. Intranasal inoculation leads potentially to bacterial colonization of the upper respiratory tract. It is widely acknowledged that commensal flora has an impact on the behaviour of the pathogens but the role of the microbiota of the upper and lower respiratory tracts in the infection kinetics of *K. pneumoniae* is not fully understood.

### 5.3.3. *K. pneumoniae* in the lungs: host immune and microbiota responses

The host-immune response to lung infection can be elicited either by *K. pneumoniae* itself or by modulation of the local (airway) or distal (gut) microbiota (Fig. 39). The complex interplay between the host immune response and the pathways developed by the bacteria to counteract and evade host defences has been well described by Bengoechea and Pessoa and Gonzalez Ferrer *et al.* (Bengoechea and Sa Pessoa, 2019; Gonzalez-Ferrer *et al.*, 2021). Upper respiratory microbiota and oral microbiota are still poorly documented but likely play a role in lung immunity states (Dickson *et al.*, 2018). These microbiota, along with the gut microbiota, can be activators of immune lung defences via NLR ligands (Brown *et al.*, 2017). They could also provide a tool for the evaluation of the health status of the respiratory tract, since Morinaga *et al.* showed in an intrapulmonary model for mice that the alpha di-

iversity of oropharyngeal microbiota is increased during pneumonia caused by *K. pneumoniae* (Morinaga *et al.*, 2019).

The first insights into the “gut lung axis” related to *K. pneumoniae* lung infections were reported by Fagundes *et al.*, who showed that GF mice infected intranasally with *K. pneumoniae* had increased bacterial burden in lungs, greater dissemination of the infection and a lower survival rate than conventional mice (Fagundes *et al.*, 2012). The protective role of gut microbiota against *K. pneumoniae* pulmonary infection has been confirmed in other studies using intrapulmonary-infected GF or oral antibiotic-treated mice (Brown *et al.*, 2017; Clarke, 2014; Fagundes *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2016). In both intranasal and intrapulmonary models, the lack or the disruption of intestinal microbiota resulted in decreased proinflammatory cytokines, notably TNF- $\alpha$ , CXCL1, CXCL2 and IL-6, and increased levels of IL-10 anti-inflammatory cytokines in lung tissue. A decrease in immune cell recruitment in the lungs, mainly of neutrophils and alveolar macrophages, has also been observed in microbiota-defective mice (Brown *et al.*, 2017; Clarke, 2014; Fagundes *et al.*, 2012). As ROS-mediated killing of alveolar macrophages primarily drives antibacterial activity in the lungs the absence of commensal microbiota leads to a defect in bacterial clearance from the lungs. Pulmonary immune defences have shown to be restored by fecal transplant or oral transfer of the microbiota consortium, and by oral administration of NLR ligands (Nod1 and Nod2), which appear to be major receptors for the activation of lung defences by commensal flora (Brown *et al.*, 2017; Clarke, 2014).

The composition of microbial communities in the gut is thus likely to play an important role in the host’s capacity to counteract a lung infection (Dumas *et al.*, 2018). Members or phyla responsible for immune activation remain to be identified but there is evidence of the protective immune effect of beneficial bacteria. For instance, administration of *Bifidobacterium logum* protected mice from lung infection after intranasal administration of *K. pneumoniae*, promoting bacterial clearance by activation of the TLR-signaling pathway and ROS production by alveolar macrophages (Vieira *et al.*, 2016). Likewise, oral gavage with *Lactobacillus plantarum* of mice subsequently infected intranasally by *K. pneumoniae* reduced the lung inflammatory response due to low recruitment of macrophages and neutrophils and cytokine production (KC, IL-6 and TNF- $\alpha$ ) in BALF (Vareille-Delarbre *et al.*, 2019).

Intestinal dysbiosis is associated with enhanced susceptibility to infection. However, inter-individual variation in microbiota composition does not influence the pathophysiology of *K. pneumoniae* lung infection. Indeed, vendor-specific differences in gut microbiota composition of genetically similar mice have no impact on the response to *K. pneumoniae* lung infection (Wolff *et al.*, 2020).

#### 5.4. Urinary tract infection

*K. pneumoniae* can infect the urinary tract of patients in either the absence or presence of endogenous material such as catheters causing, respectively, urinary tract infections (UTIs) or catheter-associated urinary tract infection (CAUTIs). Classical *K. pneumoniae* strains also lead to severe disseminated infections that are difficult to treat owing to their intrinsic antibiotic resistance (Clegg and Murphy, 2016; Flores-Mireles et al., 2015). Even if the urinary tract is an environment without a dense microbiota, bacteria have to use different mechanisms to overcome adverse events such as osmotic stress, starvation and host immune response. To adapt to this competitive environment, *K. pneumoniae* possesses multiple factors that allow its survival and effective colonization of the urinary tract. Only a few *in vivo* studies have been performed using urinary models of infection in mice, probably because of the relative complexity of the experimental procedure, which prompts authors to use rat rather than mice.

To mimic UTIs, murine models (mice or rats) involve the emptying of the animal bladder by gentle pressure and then inoculating transurethrally a bacterial suspension ( $10^7$  to  $10^8$  CFU in 50  $\mu$ L) (Table 1) (Camprubi et al., 1993; Struve et al., 2003). Fader et al. provided the first evidence of attachment of *K. pneumoniae* to the urinary epithelium in 1980 using an *in vivo* model of infection of the rat bladder, and showed the importance of fimbriae in adhesion to the urinary epithelium and in the severity of UTI (Fader and Davis, 1980). Further studies have since identified the specific role in adhesion to epithelial cells of type 1 pili that allows initiation of the infection and bacterial survival within the bladder (Maayan et al., 1985; Struve et al., 2003, 2008). This adhesion phenotype requires the FimH adhesin, which recognizes mannosylated glycoprotein onto uroepithelium, as shown for uropathogen *E. coli* (UPEC) (Langermann et al., 2000; Rosen et al., 2008b). The analysis of the phase-variable expression of *fim* genes in *K. pneumoniae* showed that the orientation of the *fim* switch is on the “on” state during urinary colonization (Struve et al., 2008). Nevertheless, *K. pneumoniae* induces urinary infection with lower bacterial loads than UPEC strains, especially at the early time points of the infection process (Rosen et al., 2008b, 2008c, 2008a). This could be explained by significant functional differences between the FimH adhesin of UPEC and that of *K. pneumoniae* (adhesin domain specificity, mannose-sensitive hemagglutination [MSHA] phenotype), despite their highly homologous amino acid sequences and predicted structures (Rosen et al., 2008b). In addition, *K. pneumoniae* could be programmed for a minimal expression of type 1 pili since the presence of an extra *fimK* gene in the *fim* operon, unlike in *E. coli*, strengthens type 1 pili repression in the bladder (Rosen et al., 2008a). The balance regulation of fimbriae expression is therefore essential for bacterial *in vivo* colonization of the urinary site. A *K. pneumoniae* K2 mutant deficient for the KpfR transcriptional repressor of a type 1-like fimbriae that exhibited a hyperfimbriated phenotype colonized the mouse bladder less extensively

than the wild type strain 24 h post-infection and was more rapidly eliminated from the urinary tract (Gomes *et al.*, 2021). The specific role of *K. pneumoniae* type 3 surface adhesin (Mrk) has also been investigated in murine models of urinary tract infection. Although deletion of *mrk* genes in *K. pneumoniae* did not affect the virulence of the bacteria in a study published by Struve *et al.*, another study carried out by Murphy *et al.* showed that a  $\Delta mrk$  deletion mutant colonized the bladder at a lower level than the wild type strain (Murphy *et al.*, 2013; Struve *et al.*, 2009). One explanation of these paradoxical findings would be that the inability of a  $\Delta mrk$  mutant to produce type 3 pili is compensated by an enhanced expression of type 1 fimbriae (Struve *et al.*, 2009).

Capsular polysaccharides are also involved in the urovirulence of *K. pneumoniae*. Use of a rat model of urinary tract infection showed that a non-capsulated strain had lower bacterial loads in the bladder, kidneys and urine than its encapsulated counterpart, with no difference in pathogen clearance (Camprubi *et al.*, 1993). Later, Struve and Krogfelt. compared wild-type and non-capsulated mutants of two strains belonging to two different K serotypes (Struve and Krogfelt, 2003). They showed that higher bacterial burdens were recovered from the bladder of mice infected with parental strains than in those infected with their non-capsulated derived mutants in both individual and competitive assays, and irrespective of the capsular serotype (Struve and Krogfelt, 2003). Additionally, the importance of the capsule in urinary infections was confirmed by a screening of a library of mutants in a murine model of a UTI in which two mutants affected in fucose production, a major component of the K16 capsule serotype, were identified as deficient in relation to bladder colonization (Struve *et al.*, 2003). LPS is also involved to a much greater extent than capsular polysaccharides in urinary tract infection. Camprubi *et al.* showed that an O-antigen LPS mutant had a lower rate of cystitis and pyelonephritis induction in rats than the wild-type strain, with a 2-log reduction of bacterial burden in the bladder, kidneys, and urine, independently of the presence of K-antigen (Camprubi *et al.*, 1993). Finally, *K. pneumoniae* mutants lacking the O5-antigen showed a drastic reduction of urinary tract colonization in rats, with lower CFU counts in the bladder, kidneys and urine compared to the parental strain (Merino *et al.*, 2000). The roles of surface polysaccharides involved in *K. pneumoniae* virulence in urinary sites are likely to be the same as those already described in other sites of infection, consisting notably in resistance to and evasion of host immunity (Gonzalez-Ferrer *et al.*, 2021; Paczosa and Meccas, 2016).

As diabetic patients are more susceptible to UTIs caused by diverse uropathogens than non-diabetic subjects, Rosen *et al.* investigated the pathophysiology of the infections by comparing uropathogen virulence in a diabetic murine model (Rosen *et al.*, 2008c). As observed with UPEC strains, *K. pneumoniae* was able to colonize the bladders of diabetic mice more efficiently than those of nondiabetic mice. Interestingly, *K. pneumoniae* exhibited greater differences in bacterial burden in the



bladder between diabetic and healthy mice than did the UPEC strain. In competition assays, although *K. pneumoniae* was outcompeted by UPEC strains in the bladder of healthy animals, diabetic status gives a greater advantage to *K. pneumoniae*, as evidenced by the clinical prevalence of *K. pneumoniae* cystitis in diabetic patients (Rosen et al., 2008c). High glucose content in the urine of diabetic individuals could explain this prevalence and so the authors grew *K. pneumoniae* and UPEC strains in healthy human urine supplemented with 2% glucose. The presence of glucose increased the growth rate of both strains at similar levels, which indicates that the advantages conferred to *K. pneumoniae* by diabetic status are not glucose-driven (Rosen et al., 2008c). Other mechanisms potentially involved in the effective colonization of diabetic individuals by *K. pneumoniae*, which may result from bacterial immune evasion or immune defects of those with the disease (neutrophil dysfunction, cytokine production), need to be investigated.

In CAUTIs, the urinary catheter provides an abiotic surface for bacterial attachment and thus facilitates long-term colonization through the formation of biofilm. Only one murine model of CAUTI caused by *K. pneumoniae* has so far been described. It consists in the insertion of a short segment of silicone tube directly into the murine bladder by the urethral route followed by transurethral inoculation of a bacterial suspension, as previously described in a UTI model (Table 1) (Murphy et al., 2013). The use of “catheterized” murine models showed that the bacterial load in the bladder of implanted mice was significantly higher than that in catheter-free mice, and even more so when implantation was done 24h before inoculation rather than simultaneously. These data support the idea that exogenous material in the bladder is rapidly coated by host molecules to form a conditioning film, which promotes bacterial colonization and persistence in the host, notably through type 1 and type 3 pili expression in most clinical *K. pneumoniae* isolates (Livrelli et al., 1996; Murphy et al., 2013). Using the murine “catheterized” model described above, Murphy et al. demonstrated that type 1 and type 3 pili play a distinct role in the bacterial colonization of mouse bladders with implanted tubes (Murphy et al., 2013). In assays in which silicone tube implantation and bacterial infection occur simultaneously, both type 1 and type 3 pili are essential for bladder and catheter colonization, but in assays in which the silicone tube was inserted 24 h before the infection, only mutants lacking at least type 3 pili were significantly impaired in the colonization of both the bladder and implants. Thus, in all likelihood, type 1 pili are involved in the first step of the colonization process in the urinary tract of mice and type 3 pili are involved mainly in the adhesion to the material coated with the host molecules, suggesting that their role prevails over that of type 1 pili in the presence of a preconditioned catheter at a later time point (48 h). These findings are consistent with the well-characterized role of type 3 pili in biofilm formation. However, mutants deficient in both type 1 and type 3 pili are not completely abolished in

this urinary infection model, evidence that the infectious process is multifactorial and could involve additional adhesins (Murphy et al., 2013).

The urinary infections seen in primary health care are often diagnosed by assessment of clinical signs (such as fever, inflammatory state, results of a cytobacteriological urine examination) and infection is established only if bacterial concentration in the urine reaches a threshold that is dependent on the general health of the patient. However, in animal experimental models, the urovirulence of bacteria is often evaluated only by determination of the bacterial burden in the urinary tract, without taking into account the clinical signs of infection. It would be of interest to expand the readouts of the urinary models to have an overall assessment of the disease. Urinary infection models allow the identification of bacterial factors essential for the uropathogenicity of *K. pneumoniae* but are insufficient to fully explain the pathophysiology of associated urinary infections. The main risk of urinary infection is the presence of a urinary catheter that is colonized by an endoluminal or an exoluminal route. The preventive strategies of urinary infections stem largely from the understanding of these colonization mechanisms. However, few studies have evaluated the role of the exo- or endoluminal route in the colonization of urinary catheters, notably in intensive care units.

#### 5.5. Role of animal models in the development of new therapies against *K. pneumoniae* infections

Animal models, which can be used to monitor bacterial virulence and host immune response, are essential to develop and test innovative therapeutic strategies. The most promising approaches are being developed to (i) assess the efficacy of natural or chemical agents, (ii) modulate host immunity by controlling the intestinal microbiota or (iii) mimic vaccination processes in immunized animals.

##### 5.5.1. Animal models to assess the efficacy of natural or chemical agents

Molecules with a broad range of bactericidal activity are an alternative to classical antibiotic treatments. In healthy and immunosuppressed pulmonary infection models, intravenous injection of the short synthetic  $\beta$ -sheet folding peptide IRIKIRIK (IK8L) or intraperitoneal injection of polyionene polymers have been shown to improve mice survival during hvKp or MDR *K. pneumoniae* infection. Both treatments reduce bacterial burden in tissues (lung, blood, liver, spleen and kidney) and infection-induced injuries in the lungs (Lou et al., 2018; Tan et al., 2015). In addition, administration of IK8L attenuates the inflammatory response by decreasing immune cell recruitment in the lungs and by reducing the production of pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) through JAK/STAT3 signalling (Tan et al., 2015). Recently, the AA139 peptide, known for its bactericidal activity through modulation of membrane phospholipids, entrapped in polymeric nanoparticles (PNP) or in lipid-core

micelles (MCL), was administered by endotracheal aerosolization to rats with ESBL *K. pneumoniae* pulmonary infection. The administration of AA139-PNP resulted in a rapid but short-lasting decrease (6h) in bacterial load in the lungs. In contrast, the administration of AA139-MCL produced a slow but prolonged decrease in bacterial load in the lungs that persisted for at least 24h. Both entrapped treatments given daily for 10 days to infected rats significantly increased survival in comparison to rats treated with free AA139 or placebo (van der Weide et al., 2020). The antimicrobial properties of carvacrol, a plant phenolic monoterpene, against *K. pneumoniae* were recently evaluated in a systemic infection model. After peritoneal injection of LD50 dose of a MDR *K. pneumoniae* strain, oral gavage with carvacrol (10, 25 or 50 mg/kg) increased mouse survival and reduced bacterial load in peritoneal lavage fluid 24h post-infection (De Souza, 2021).

A more specific alternative treatment is the use of narrow-spectrum molecules to directly target the pathogen. For instance, synthetic nucleic acid analogues called phosphorodiamidate morpholino oligomers (PPMOs) are antimicrobial molecules that inhibit bacterial growth in a pulmonary infection model. The PPMOs, conjugated with an arginine-rich peptide, penetrate across the outer membrane of the bacteria and prevent translation of a specific *K. pneumoniae* essential gene by selectively binding mRNA in an antisense manner. Intranasal administration of AcpP-PPMO targeting the *acpP* gene involved in the biosynthesis of fatty acids and phospholipids improved survival of mice in a dose-dependent manner and reduced bacterial burden by 3-log in the lungs (Geller et al., 2018). Phage-therapy, another alternative treatment, was studied in a murine model of pneumonia and proved effective to reduce *K. pneumoniae* infections (Anand, 2020; Cao et al., 2015; Chhibber et al., 2008). Using phage SS specific to *K. pneumoniae* strain B5055, Chhibber et al. showed that intraperitoneal injection of phages in mice shortly before (3h and 6h) or at the same time as intranasal *K. pneumoniae* infection, significantly reduced lung bacterial counts and achieved complete clearance of the bacteria compared to untreated mice (Chhibber et al., 2008). Compared to the intraperitoneal route, nasal administration of phages is closer to the clinical route of delivery, which consists in drug nebulisation for local infections like pneumonia, and delays phage clearance by host immunity (Cao et al., 2015). A local treatment by intranasal injections of different doses of the bacteriophage 1513 ( $2 \cdot 10^9$ ,  $2 \cdot 10^8$ , or  $2 \cdot 10^7$  PFU/mouse) was also effective to treat lethal pneumonia caused by the MDR *K. pneumoniae* strain in mice. In addition to improving mouse survival, treatment with phage 1513 reduces lung injuries, bacterial burden and inflammatory cytokine productions (TNF- $\alpha$  and IL-6) in the lungs compared to PBS treatment (Cao et al., 2015). More recently, similar results were obtained with phage BPA43, which reduced lung bacterial loads and tissue lesion severity in a *K. pneumoniae*-induced pneumonia model after a single intranasal dose of phage 2h post-infection (Anand, 2020).

Animal models are a very interesting tool to test innovative chemical antibacterial agents against pathogenic *K. pneumoniae* involved in bacteremia and bronchopneumonia and will be necessary to predict adverse effects on microbiota communities such as dysbiosis or development of resistance.

#### 5.5.2. Animal models with controlled intestinal microbiota

As mentioned in section 5.3.3. (*K. pneumoniae* in the lungs: host immune and microbiota responses), daily gavage of beneficial bacteria (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) is a promising strategy to prevent *K. pneumoniae* lung infections via modulation of immune response through activation of the gut-lung axis. These data highlight the importance of the gut microbiota in producing an immunomodulatory effect on distal sites such as the pulmonary environment. However, *in vivo* models using beneficial bacteria have so far focused more on the effects of prevention on infection than on the therapeutic effects against an already established infection. In the case of systemic hvKp infection, mice exhibited significantly altered intestinal microbiota characterized by a decreased abundance of *Ruminococcaceae* that correlated with a reduction in secondary bile acid (SBA) production. Interestingly, oral treatment of mice with SBAs (deoxycholic acid [DCA] and lithocholic acid [LCA]) significantly improved survival rate of infected mice, and reduced bacterial load and inflammatory response in the liver and blood (Zheng et al., 2021). The intestinal microbiota thus plays a pivotal role in the maintenance of health, and murine models provide the opportunity to identify significant alterations in the structure of intestinal communities in order to potentially develop targeted clinical diagnosis or treatments of *Klebsiella* infections.

#### 5.5.3. Immunized animal model mimicking the vaccination processes

The activation of adaptive immunity, humoral immunity (mediated by antibodies) and cellular (mediated by T-cells) immunity, is primordial to obtain the effective eradication of bacterial infections. Capsular polysaccharides are one of the most immunogenic virulence factors of *K. pneumoniae* that could be used as an effective antigen for host immunization. The ability of anti-CPS antibodies to inhibit infection was first evaluated by Cryz et al. in a rat model of lung infection (Cryz et al., 1986). Intramuscular immunization of rats with anti-K2 CPS antibodies 14 days before intrapulmonary challenge with a K2 serotype *K. pneumoniae* strain promoted bacterial clearance from the lungs, reduced pathological lung alterations and prevented bacteremia (Cryz et al., 1986). Likewise, protection against lung infection has also been observed in mice immunized with two K1-CPS-specific monoclonal antibodies (mAbs) (Diago-Navarro et al., 2017). Briefly, mice treated with either one or both mAbs 2h before intraperitoneal injection of K1 hvKp or 24h before intratracheal inoculation of K1 hvKp had enhanced survival and a drastic decrease in bacterial CFU levels in lungs, liver and spleen

tissues at 24h post-infection compared to PBS treated mice. Using an intravital microscopy approach, the authors also showed that mAb treatment enhanced opsonophagocytic action by Kupffer cells, a key component of the hepatic innate immune system (Diago-Navarro *et al.*, 2017). CPS are not the only surface compound with immune-protective potential in murine models of pneumonia. Intramuscular or intranasal administrations of at least 50 µg of purified *K. pneumoniae* LPS two weeks before lung infection led respectively to a 2.2- and 2.5-log decrease in bacterial load in the lungs. However, even at the lower doses (25µg), intranasal administration of LPS was associated with adverse damage to the lung tissue by the potent inflammatory response. Intramuscular administration thus seems to be the most suitable route for administration of LPS-based vaccines (Yadav *et al.*, 2005). Whatever the case, even after intramuscular administration free LPS can trigger pyrogenic and toxic effects in mice. To counteract these effects, Chhibber *et al.* incorporated the LPS into phospholipid vesicles (liposomes), which led to a 10-fold reduction of toxicity compared to administration of free LPS (Chhibber *et al.*, 2004). In a model of lung infection in rats, intramuscular injection of liposome-incorporated LPS limited bacterial burden in lung tissues, at similar levels to those obtained in free LPS-treated rats. Animals treated with liposomal LPS exhibited efficient innate and adaptive immune responses against *K. pneumoniae* lung infection, but with a lower kinetics of efficacy than with free LPS (4 days after treatment with liposomal LPS versus 4h with free LPS). However, activation of the humoral specific immune response, measured by the number of antibody-forming cells, was significantly higher in animals treated with liposomal LPS than in those treated with free LPS (Chhibber *et al.*, 2004). The perspective to develop a non-living complex vaccine against *K. pneumoniae* was strengthened by the use of *Klebsiella*-derived extracellular vesicles (EVs), which prevented bacteria-induced lethality in an *in vivo* mouse sepsis model. In a sepsis model, naïve mice treated by intraperitoneal injection of either sera from EV-immunized mice or splenocyte extracted from EV-immunized mice had higher survival rates than naïve mice treated with splenocytes or sera from sham-immunized mice. These findings confirm the protective effect of *K. pneumoniae* EV vaccination conferred by both cellular and humoral immunity (Lee *et al.*, 2015). In a mouse lung infection model, *K. pneumoniae* mutants attenuated in virulence can also be good candidates for live-vaccine development. Immunization of mice by intranasal inoculation with a non-capsulated  $\Delta cpsB$  mutant 6 weeks before pulmonary infection with its virulent wild-type parental strain significantly enhanced survival compared to that observed in non-immunized mice (Lawlor *et al.*, 2006). Protective immunization was also effective after orogastric inoculation of an avirulent mutant of hvKp. Indeed, oral administration of  $10^7$  CFU of a hvKp CG43 avirulent mutant deficient in uracil permease protected mice against a second oral infection 6 weeks later with the wild-type strain compared to non-immunized mice (Tu *et al.*, 2009). In addition, intraperitoneal immunization with avirulent hvKp OMPs ( $\Delta pal$  and  $\Delta lppA$ ) or CPS ( $\Delta magA$ ) mutants

delayed mice mortality after intraperitoneal injection of the wild-type strain 4 weeks after immunization compared to non-immunized mice. Immunization of mice with  $\Delta lppA$  mutant strains achieved 100% survival up to 28 days whereas only 25% of non-immunized control mice survived within 6 days of infection (Hsieh et al., 2013). In another study, mice immunization with K2044  $\Delta magA$  mutant (K O1) showed a protective effect against hvKp infection, with a more protective effect against hvKp O2 LPS strain. Compared to a full mortality within 6 days in the unimmunized control group, 62.5% of the immunized mice survived without any symptoms of disease through 28 days after challenge with A4528 (O1:K2), but only 12,5% of the immunized mice survived within 19 days of NTUH-K2044 (O1:K1) infection. The protective effect was attributed to the production of antiserum against LPS O1 with a more efficacy against the A4528 strain (O1:K2) because the capsule would mask the O1 antigen in the K2044 strain (O1:K1) (Hsieh et al., 2012).

Altogether, these results should encourage the development of *in vivo* models to investigate alternative therapeutics that have robust and specific antibacterial efficacy, negligible toxicity and the ability to limit the development of resistance.

## Conclusion

Owing to the emergence of hypervirulent strains and the pivotal role of *K. pneumoniae* in the initial acquisition and spreading of antibiotic-resistant genes, the infections caused by this pathogen are increasingly difficult to treat and pose a direct threat to human health. To date, *in vivo* murine models are the most reliable model to identify complex interactions between the pathogen and its host in parallel with the development of innovative prophylactic or therapeutic approaches. Because animal models raise ethical questions, the development of non-invasive approaches should be extended to reduce the number of experimental animals and to replace them by alternative *in vivo* models (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Dyctiostelium discoideum*, *Danio rerio*, *Galleria mellonella*) (Bengoechea and Sa Pessoa, 2019).

Although many bacterial functions have now been characterized, the infection biology of *K. pneumoniae* is still poorly understood. New overall approaches are needed that take into account the genetic background of the host and bacterial diversity and tropism. Current mouse models fail to mirror the extensive genetic diversity that exists in the human population that could have an effect on the pathophysiology of infection. The use of innovative experimental systems like the Collaborative Cross (CC), whose genetic diversity matches that of humans would help to better understand how genetics influence infectious disease (Panthier and Montagutelli, 2012). Finally, whereas little is known about the population structure of *K. pneumoniae*, which has a highly genetic diversity, future studies would be aware of the bacterial diversity and bacterial evolution.

---

## Partie expérimentale

---

Rôle du fimbriae Kpg de type « chaperone-usher » de *K. pneumoniae* : avant-propos

En milieu hospitalier, *K. pneumoniae* est un pathogène opportuniste à l'origine d'infections liées aux soins, notamment pulmonaires et urinaires. Grâce à sa capacité à former des biofilms, *K. pneumoniae* colonise facilement les dispositifs médicaux invasifs, ainsi que les épithéliums humains tels que ceux des voies aériennes supérieures et du tractus digestif. Plusieurs facteurs de virulence de *K. pneumoniae* sont décrits pour leur rôle dans l'implantation de la bactérie au sein d'un microbiote complexe et d'un environnement parfois hostile (Paczosa and Meccas, 2016). Parmi ces facteurs bactériens, les fimbriae de type « chaperone-usher » ont été largement décrits ; ils sont notamment impliqués dans l'adhésion aux surfaces biotiques et abiotiques, et dans les processus physiopathologiques des pathogènes en jouant par exemple un rôle dans l'implantation de la bactérie au niveau intestinal. Plusieurs approches *in silico* ont permis l'identification de nouveaux opérons CU dans le génome de *K. pneumoniae* (Gato et al., 2020; Khater et al., 2015; Wu et al., 2010; Zhou et al., 2015), et notamment l'opéron *kpgABCD* dans le génome de la souche clinique de *K. pneumoniae* LM21. La délétion du gène codant la protéine *usher* potentielle KpgC diminue la capacité de *K. pneumoniae* à coloniser le tractus digestif en modèle murin (Khater et al., 2015).

La première partie de ce travail a consisté à déterminer par une analyse *in silico* la prévalence du système Kpg au sein des entérobactéries, et plus particulièrement au sein du genre *Klebsiella*, ainsi qu'à caractériser les différentes structures de l'opéron Kpg. Nous avons ainsi montré que l'opéron *kpgABCD* est majoritairement retrouvé au sein du genre *Klebsiella*, avec un nombre de gène et une organisation génomique variable. La seconde partie de ce travail a consisté à valider l'expression de Kpg au niveau membranaire, ainsi qu'à identifier son rôle dans l'adhésion bactérienne. Pour cela, un mutant isogénique délété de la totalité de l'opéron *kpgABCD* ( $\Delta kpgABCD$ ) a été construit, et son phénotype a été analysé comparativement à celui de la souche sauvage.



Publication n°2 (non publiée)

## **New insight in the distribution and the role of the *Klebsiella pneumoniae* Kpg chaperone-usher fimbrial system**

Laura Joseph<sup>1</sup>, Olaya Rendueles-Garcia<sup>2</sup>, Christiane Forestier<sup>1</sup>, Damien Balestrino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, CNRS, LMGE, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>2</sup> Institut Pasteur, Université de Paris, CNRS, UMR3525, Microbial Evolutionary Genomics, F-75015, Paris, France

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, Université Clermont Auvergne, CNRS,  
F-63000 Clermont-Ferrand, France

## Introduction

*Klebsiella pneumoniae* is a Gram-negative bacterium with an extensive genetic diversity, which can be found in a wide range of environmental niches such as soil, water, or the surface of mucosa in animals (Podschun and Ullmann, 1998; Wyres et al., 2020). This member of enterobacteriaceae family is also an opportunistic pathogen causing nosocomial pneumonia, urinary tract and blood stream infections (Chung, 2016; Gonzalez-Ferrer et al., 2021). These infections remain challenging to treat due to the frequent carrying of antibiotic resistance genes by classical (cKp) strains (Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), 2019; Wyres and Holt, 2018). In addition, hypervirulent *K. pneumoniae* (hvKp) clones harboring many virulent determinants and causing severe community-acquired infections in healthy individuals have emerged. These aspects have led to the recognition of *K. pneumoniae* as a major threat for global public health by many organizations (Wyres et al., 2020).

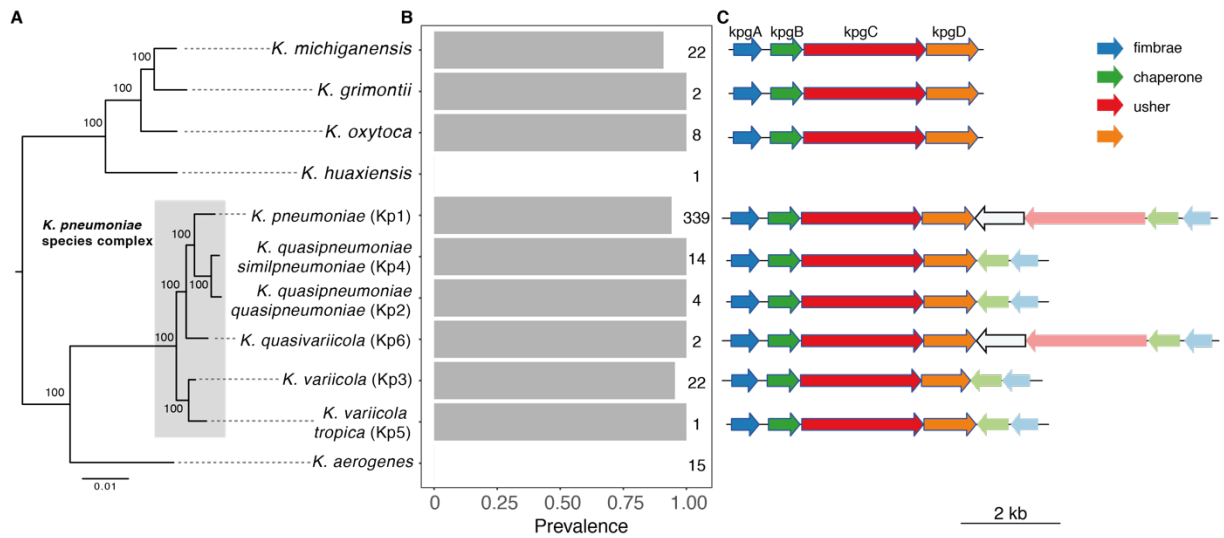
Several genetic factors involved in the infectious process of *K. pneumoniae* have been described (Joseph et al., 2021; Paczosa and Meccas, 2016). A subset of genes encoding pathogenicity factors are present on the core genome of most strains (Wyres et al., 2020); they encode notably the polysaccharidic capsule, fimbriae, lipopolysaccharides (LPS), and siderophores (Bengoechea and Sa Pessoa, 2019; Gonzalez-Ferrer et al., 2021; Joseph et al., 2021; Paczosa and Meccas, 2016). Other strain-specific virulence factors encoded by the accessory genome are related to the severity of *K. pneumoniae* infection. This accessory genome divides *K. pneumoniae* strains into opportunistic, hypervirulent, and multidrug-resistant groups (Martin and Bachman, 2018; Russo et al., 2018; Wyres et al., 2020). It is widely admitted that *K. pneumoniae* infections are preceded by the gastrointestinal tract colonization or by the colonization of invasive medical devices through biofilm formation (Donskey, 2004; Podschun and Ullmann, 1998).

*K. pneumoniae* displays several adhesion factors classified as fimbrial, non-fimbrial or polysaccharide adhesins, which are recognised as essential factors for pathogenicity (Berne et al., 2015; Li et al., 2014a; Paczosa and Meccas, 2016). The fimbrial adhesins, forming hair-like protein appendage present on the bacterial surface, are distinguished on the basis of their assembly mechanism, with the chaperone/ushe (CU)-dependent pathway that represents the most abundant secretory pathway. The CU assembly requires the joint action of two proteins, a periplasmic chaperone that binds and carries the fimbrial subunits to a secretory protein called ushe, which permits the transport of the subunits through the outer membrane and the assembly of the fimbriae at the bacterial surface (Busch and Waksman, 2012). CU fimbriae are found in a variety of Gram-negative bacteria, but are mostly described in *Enterobacteriaceae* and among them, the type 1 and P fimbriae of *E. coli* are frequently used as models to describe the general assembly pathway of CU fimbriae (Costa et al., 2015; Lillington et al., 2014).

The gene clusters encoding CU systems contain a minimum of an usher-, a chaperone- and a fimbrial/pilus subunit-encoding gene. Because the number of genes encoding chaperones or fimbrial subunits may vary in the CU pathway-encoding gene clusters, Nuccio and Bäumlér proposed a classification scheme based on the usher protein that is always encoded by only one gene. The CU fimbriae are thus divided into six phylogenetic clades termed  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\pi$ -,  $\kappa$ - and  $\gamma$ -fimbriae, with the  $\gamma$ -fimbriae clade subdivided into four subclades (Nuccio and Bäumlér, 2007). This classification correlates with a distinct gene arrangement within clusters. For instance, the  $\pi$ - and  $\kappa$ - clades both share a same core structure organization, encoding first the major subunit then a chaperone followed by an usher (MCU-organized with M for major subunit, C for chaperone and U for usher), although the  $\alpha$ -,  $\beta$ -, or the  $\delta$ -clades have distinct gene organization: CMUT (T for the fimbrial tip), MCU and MCUT, respectively (Nuccio and Bäumlér, 2007).

*K. pneumoniae* expresses several types of CU fimbriae conferring the capacity to attach to different surfaces; up to nine different CU systems have been identified in a single strain (Wu et al., 2010). Almost all *K. pneumoniae* isolates possess both classic types of CU systems: type 1 and type 3 fimbriae. Type 1 fimbriae of *K. pneumoniae*, encoded by the *fim* operon, is highly homologous to type 1 fimbriae of *E. coli* (Fader et al., 1982) and promotes mannose-specific adhesion to human mucosal or epithelial surfaces (Fader and Davis, 1980; Fader et al., 1979, 1982, 1988; Maayan et al., 1985; Struve et al., 2008). Type 3 fimbriae are encoded by the *mrk* operon, either carried by chromosome or plasmid, and, while firstly characterized in *K. pneumoniae*, it is commonly found in other *Enterobacteriaceae* strains (Burmølle et al., 2008). Type 3 fimbriae are essential for bacterial adhesion to abiotic surfaces uncoated or coated with host-derived molecules, and are thus considered as important enhancer of biofilm formation (Di Martino et al., 2003; Jagnow and Clegg, 2003).

Thereafter, several *in silico* approaches allowed the identification of new CU operons potentially encoding fimbriae in the genome of classical and hypervirulent *K. pneumoniae* isolates (Gato et al., 2020; Khater et al., 2015; Wu et al., 2010; Zhou et al., 2019). Genome sequencing of a carbapenem-resistant ST-15 *K. pneumoniae* isolate (Kp3380) and its comparison with *K. pneumoniae* genomes enabled to identify the CU system Kpi that is associated with the ST-15 clone, and contributes to biofilm formation and adhesion to different host tissues, as well as to *in vivo* intestinal colonization and infection of *Galleria mellonella* (Gato et al., 2020). In the genome of the hypervirulent NTUH-K2044 strain, nine operons encoding putative CU system were identified by searching for the Pfam domain of fimbrial protein (Wu et al., 2010). By searching for conserved motifs of usher encoding genes in the *K. pneumoniae* LM21 genome, Khater et al. identified eight potential CU fimbrial loci encoding  $\gamma$ - and  $\delta$ -fimbriae clades, with two corresponding to the previously described *fim* and *mrk* operons (Khater et al., 2015). Previous results indicated that one of them, the *kpg* operon (*kpgABCD*) encoding potentially



**Figure 40: Presence and genomic organization of the Kpg systems in *Klebsiella* species.** **A.** Rooted phylogenetic tree of *Klebsiella* species based on the core genes. **B.** Prevalence of Kpg systems in each species. Numbers represent the total number of genomes analysed per species. **C.** Most common genomic architecture of the Kpg locus in each species. White arrow indicates ORF with unknown function.

a  $\gamma$ 1-fimbriae, was involved in mice intestinal colonization (Khater *et al.*, 2015). In this study, we further investigated the distribution and evolutionary history of the Kpg system across Prokaryotes by an *in silico* approach and assessed the expression and the role of this fimbriae in adhesion processes *in vitro*.

## Results

### Abundance and organization of Kpg systems in *Klebsiella* species

In *K. pneumoniae* strain CH1157, the *kpg* operon is composed by the four genes *kpgABCD*, encoding potentially the major submit (KpgA), the chaperone (KpgB), the usher (KpgC) and the adhesin (KpgD) respectively. To identify Kpg systems in other *Klebsiella* genomes, we defined an independent and customizable model describing the genetic composition and organization of the operon based on the annotated genome of *K. pneumoniae* strain CH1157. To consider a Kpg system complete, each protein (KpgA, B, C and D) had to be present at least once in the operon. Each protein was associated with a hidden Markov model (HMM) profile downloaded from PFAM or generated for the purpose of this study (see Methods). KpgA had one distinct domain from PFAM (PF00419.21) and KpgB and KpgC were composed of 2 and 3 functional domains respectively. No PFAM protein family matched KpgD. Different cut-offs, degree of profile coverage and e-values were tested, but these did not affect the number of detected systems in *Klebsiella* spp (see Methods, Table S1).

A total of 387 Kpg systems was detected in the 424 complete *Klebsiella* genomes analyzed. The presence of Kpg systems in *Klebsiella* spp. varied across species but most of them (319) were found in the 339 genomes of *K. pneumoniae*, the most represented species of our dataset (~80% of all genomes). Whereas most genomes from the *K. pneumoniae* species complex harbored Kpg, no Kpg system was detected within *K. aerogenes* genomes (n=15) (Figures 40 and S2). Additionally, most genomes encoded only one Kpg system, but seven genomes, six of which belonged to *K. michiganensis*, harbored two different Kpg systems.

The genomic organization of the Kpg system was then studied, and the most common genomic architecture of Kpg locus in each species is represented in Figure 40. An architecture with one homolog of each gene organized in tandem was found for all genomes of *K. oxytoca* (n=8) and *K. grimonti* (n=2), and for 20 out of 22 genomes of *K. michiganensis* (Figures 40 and S2). All genomes of *K. quasipneumoniae subsp quasipneumoniae* (n=4) and *K. variicola subsp tropica* (Kp5) (n=1), over 90% of the *K. variicola subsp variicola* (Kp3) genomes (20 out of 22 genomes) and ca. 35% of the *K. pneumoniae* (Kp1) genomes (87 out of 339 genomes) had one homolog of each gene followed by a different homolog of *kpgB* and *kpgA* in the complementary strand (Figure 1 and S1). The *K. pneumoniae* CH1157 strain used in this study presented a such organization. However, the most common organization of the Kpg system in *K. pneumoniae* (n=319) presented a complete *kpgABCD* operon followed by an extra

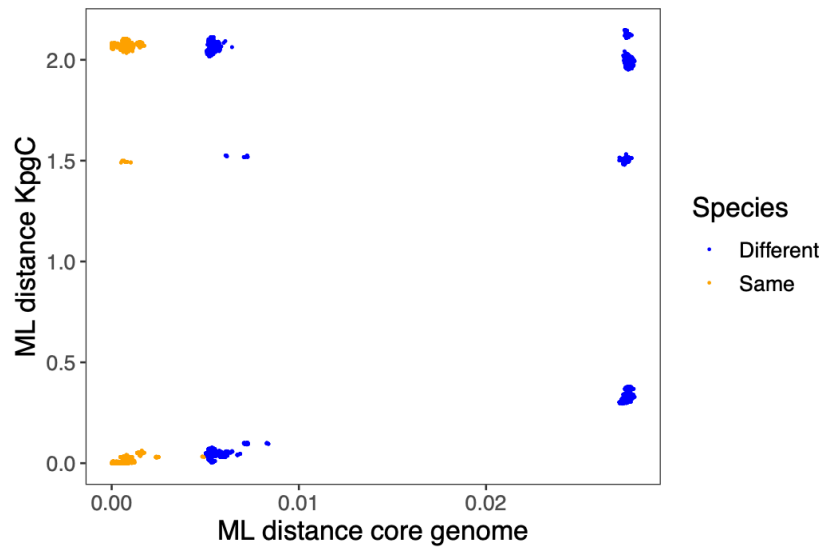


Figure 41: **Correlation between the maximum likelihood distances between core genome and KpgC.** The maximum likelihood distance between *K. pneumoniae* pairs of core genome (based on the 695 proteins) and those of largest protein of the system (from the conserved *kpgABCD* operon), KpgC, were calculated and represented on the horizontal axis and on the vertical axis, respectively. Blue dots represent pairs of genome from the same specie of *Klebsiella* genus and orange dots represent pairs of genome from two different species of *Klebsiella* genus.

*kpgABC* on the complementary strand. Such organization was found in the multidrug resistant NJ ST258, the hypervirulent NTUH K2044 and in both strains of *K. quasivariicola* included in this study (Figures 40 and S2). Other genomic architectures found in *Klebsiella spp.* genomes are presented in Figure S2 (Figure S2).

No specific relationship with virulence or antibiotic resistance with the organization of the Kpg system in the *Klebsiella* genomes was observed (Multifactorial ANOVA, Score ~ ST \* Genomic organization,  $P < 0.001$  for virulence and resistance). The three genomes with two homologs of *kpgB* and *kpgC* had very high virulence scores (Figures S3). However, there was a strong phylogenetic inertia in the dataset (Table S2). Taken together, the Kpg system are widely distributed in *Klebsiella* species, albeit totally missing in some of them.

#### Evidence of horizontal gene transfer of the Kpg system

Then, the evolution of the Kpg operons has been investigated. One evolutionary scenario is that Kpg systems have been acquired at the root of the *Klebsiella* tree, and underwent several loss events, most notably in the branch of *K. aerogenes*, and diversification events. To study this, we considered each different genomic organization at the tip of the tree as a state (including absence of Kpg system) and reconstructed the ancestral states at each node using PastML. This estimated the average number of changes in Kpg genomic architecture per branch to be 0.34. Ancestral state reconstruction also suggested that the absence of Kpg in *K. aerogenes*, is most likely due to a unique evolutionary event, and that the ancestral state of the *K. pneumoniae* clade corresponds to the genomic organization by NJ ST258 that is the canonical organization with extra homologs of *kpgABC* in the complementary strand (Figure S2). However, this state changes repeatedly and independently throughout the clade. We thus predicted that this locus may be evolving fast by horizontal gene transfer. If this were so, the phylogeny of the Kpg system would be different to that of the core genome. We focused on the largest core protein in the system, KpgC from the conserved *kpgABCD* operon (discarding the proteins found in the complementary strand), and compared its phylogeny to the phylogeny of *Klebsiella* based on the 695 proteins of its core genome. We calculated the maximum likelihood distance between pairs of core genome and those of KpgC. The relation of the two measures is not linear and revealed that pairs of genomes that are very close in the tree can have very distant KpgC (Figure 41), and vice versa. Further, the topology of the KpgC tree and that of the core genomes is very distinct (Figure S4). Similar results were obtained when analyzing solely the genomes with a Kpg system harboring only one homolog of each protein, like CH1157 (Figure S5). We observed a correlation between the core genome and KpgABCD system between some pairs of genomes, however, there are clearly some Kpg systems that diverge from the core genome evolution. Further, we calculated the Robinsons-Foulds

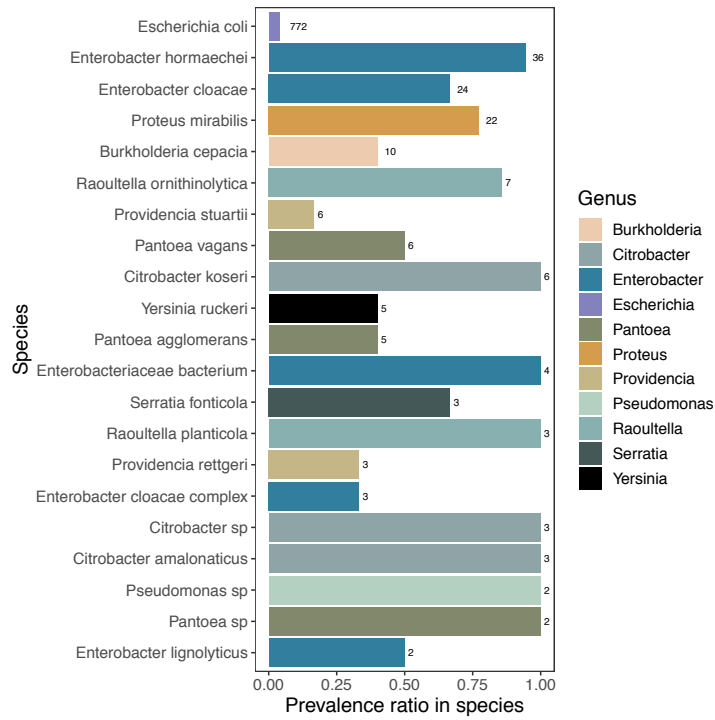


Figure 42: **Prevalence of Kpg systems outside the *Klebsiella* genus.** Numbers represent the total number of genomes analysed per species. Y-axis is ordered by increasing number of genomes analysed for each species.



metric to determine the distance between the phylogenetic trees of KpgC and that of the core genome. We then compared it to the distances of one gene coding for an outer membrane protein (*ompC*), one exported protein (*fepA*), two housekeeping genes (*rpoB* and *gyrA*) and 25 randomly chosen genes from the core genome. The high distance between KpgC and the core genome strongly suggests that these trees have very different typologies. This suggests that the Kpg system was acquired at multiple independent times by horizontal gene transfer, rather than at the root followed by subsequently lost. The origin of the degraded Kpg system on the complementary strand was then investigated. We hypothesized that it is the result of a duplication and translocation event. The phylogeny of all ushers (KpgC) proteins, including those of the complementary strand, was reconstructed. Two clearly separated clades are visible: one clustering with the KpgC from the KpgABCD system, and a second corresponding to those found on the complementary strand (Figure S6). This suggest that these two systems result from two independent acquisitions rather than a duplication/translocation of the system. Taken together, these results suggest that Kpg systems has been acquired by horizontal gene transfer multiple times during *Klebsiella* evolution.

#### Kpg systems are also found in other Gammaproteobacteria

To understand the distribution of the Kpg systems in the diversity of Bacteria, we search it in all complete genomes of RefSeq (downloaded April 2019). In opposition to our analyses in *Klebsiella*, the total number of systems detected varied significantly depending on the stringency of the cut-offs used. Using the most stringent model, we find 5 species outside the *Klebsiella* genus with a Kpg system (*E. coli*, *Raoultella* spp. and *Enterobacter* sp). Using the most permissive model, up to 40 different species had a complete Kpg system, with different degrees of prevalence across the genomes. Kpg was present in most *Citrobacter* genomes, a clade closely-related to *Klebsiella*, and in clades like *Burkholderia* and *Pseudomonas* spp that do not belong to the Enterobacteriaceae family (Figure 42). Interestingly, Kpg systems were found to be very rare in *E. coli* (less than 10% of the genomes), totally absent in *Salmonella*, but very common in *Proteus mirabilis* since almost 75% of the genomes had a complete Kpg system. The genomic organization of these systems was almost exclusively that observed in the reference genome CH1157, with one homolog of each gene ordered contiguously. We rebuilt a new phylogenetic tree based on the concatenated KpgABCD proteins, and a phylogenetic tree of core genomes for all 577 genomes with Kpg system. The comparison of the patristic distances of the Kpg system and core genome for every pair of genomes, suggested some degree of horizontal gene transfer across families, as observed within *Klebsiella* spp. (FigureS7).

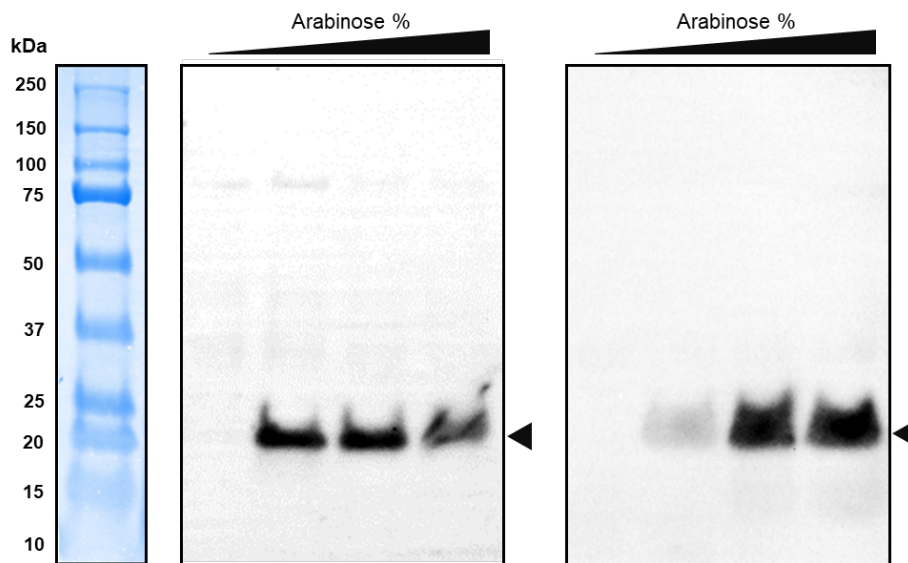


Figure 43: **Anti-KpgA Western blot analysis.** Total protein extracts (left) and membrane protein extracts (right) of *K. pneumoniae* CH1476 harbouring pBAD24\_ *kpgA*::HA were analysed by Western blotting with an anti-HA antibody. For both protein extracts, bacteria were growth in LB medium with 4 different arabinose concentrations (0%, 0,01%, 0,02%, 0,1%, 0,2% et 0,4%). Ladder was represented after Coomassie staining. Expected KpgA protein size was indicated with black arrow.

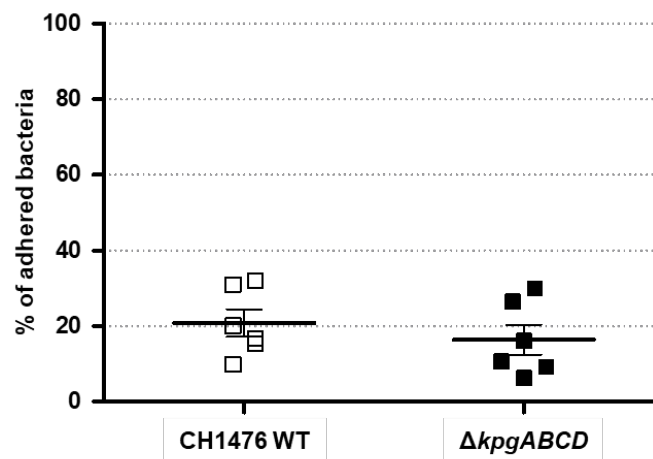


Figure 44: **Bacterial adhesion on I407 epithelial intestinal cells.** Results are expressed as the percentages of adhered bacteria compared to the inoculum. The percentages of adhered *K. pneumoniae* CH1476 wild-type and  $\Delta kpgABCD$  mutant strains were represented with white and black square respectively. Median values were represented with black lines. Data from six independent experiments are shown as means  $\pm$  SEM.

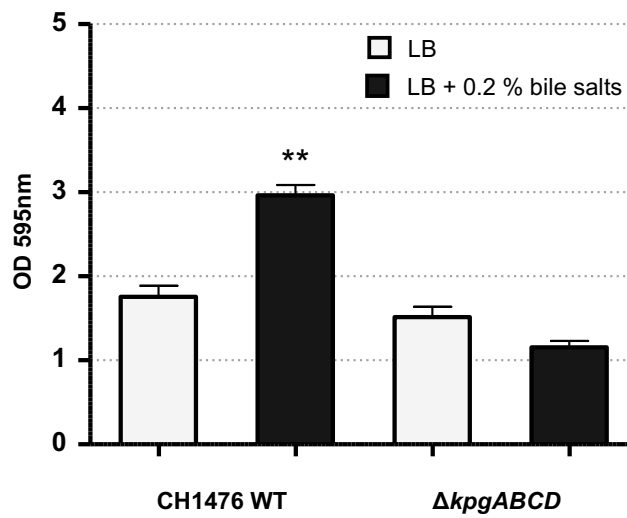


Figure 45: **Biofilm formation in the presence or absence of bile salts.** Biofilm biomass of *K. pneumoniae* CH1476 wild-type and  $\Delta kpgABCD$  mutant strains was quantified by optical density at 570 nm after crystal violet staining. Biofilms were growth in LB medium (light grey) or LB medium supplemented with 0.2% bile salts (black). Data from six independent experiments are shown as means  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis and multiple comparisons Dunn's nonparametric tests. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,025$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ .

### KpgA is expressed in membranes of *K. pneumoniae*

To assess if the Kpg system was expressed and gave rise to protein complex on bacterial surface, a recombinant gene expressing a HA-tagged KpgA was constructed within the *kpgABCD* operon on the chromosome of *K. pneumoniae* CH1476 strain, KpgA being the putative major subunit of the fimbriae. Western-blot analysis of bacterial whole cells using anti-HA antibodies did not allow the detection of the recombinant protein, in concordance with the very weak expression of the *kpgABCD* operon in our laboratory conditions (data not shown). We next cloned the whole *kpgABCD* operon harboring the HA-tagged *kpgA* in the pBAD24 plasmid vector to allow controlled expression by arabinose induction. The resulting recombinant plasmid, called pBAD24\_*kpgA*-HA, was transformed in a mutant of *K. pneumoniae* CH1157 deleted of the whole *kpg* operon ( $\Delta kpgABCD$ ). The HA-tagged KpgA protein was then detected in whole cells total protein extracts (Figure 43, left) and in membrane protein extracts (Figure 43, right) of strain harboring this construct ( $\Delta kpgABCD$ /pBAD24\_*kpgA*-HA), but only after induction with arabinose. However, no protein expression gradient was observed when using increasing arabinose concentrations (Figure 43). The HA-tagged KpgA protein was similarly detected when the pBAD24\_*kpgA*-HA plasmid was introduced in *E. coli* MG1655 strain but with a protein expression gradient following arabinose concentration gradient (Figure S8). These findings indicated that the four genes of the conserved operon *kpgABCD* are sufficient to produce KpgA at the membrane level, but at an undetectable level in the wild-type strain.

### Kpg fimbriae promote biofilm biomass in the presence of bile salts

The role of the Kpg fimbriae in *K. pneumoniae* adhesion on abiotic and biotic surfaces was assessed by phenotypic analysis of a deletion mutant,  $\Delta kpgABCD$ . The ability of the *K. pneumoniae*  $\Delta kpgABCD$  mutant to adhere to intestinal Int-407 epithelial cell monolayer was similar to that of the parental wild-type strain, with respectively 21% and 16% of adhering bacteria compared to the inoculum (Figure 44). Measurement of biofilm-formation on abiotic surfaces (microtiter-plates) by a crystal violet staining approach showed that the two strains, CH1476 wild-type strain and its  $\Delta kpgABCD$  mutant, also showed similar results (Figure 45). However, the biomass formed by the wild-type strain was significantly larger in the presence of 0.2% bile salts ( $P < 0.0001$ ) and this effect was not observed with the  $\Delta kpgABCD$  (Figure 45). When measuring the number of CFU in each biofilm, no significant difference was observed in biofilms formed in LB or LB supplemented by 0.2% bile salts whatever the strain (CH1476 WT or its isogenic  $\Delta kpgABCD$  mutant) (Figure S9). However, the growth rate of planktonic bacteria in the presence of 0.2% bile salts was obviously decreased, but at a similar level for both the CH1476 WT strain and its isogenic mutant (Figure S10).

## Discussion

A search of Kpg systems in 424 *Klebsiella* genomes database based on protein sequences of Kpg system of the reference genome CH1157 demonstrated the high prevalence of this system in the majority of *Klebsiella* species, with an exception for *K. aerogenes* genomes. The same analysis carried out on a database of prokaryotic genomes revealed that, depending on the permissiveness of the model, the Kpg system was found in other species of the *Enterobacteriaceae* family (such as *Citrobacter*, *Enterobacter* and *Proteus* species). This fimbrial gene cluster was also detected in *Burkholderia* and *Pseudomonas spp*, both clades not closely-related to *Klebsiella* genus. Surprisingly, Kpg was rarely found in *E. coli* genomes and not present at all in *Salmonella* genomes. The diversity of species which carry a Kpg system, sometimes phylogenetically distant from *Klebsiella* species, gives first clues to a potential exchange of this fimbrial cluster element between bacteria via horizontal gene transfer. It seems however that this operon was mainly restrict to the *Klebsiella* genus since a Kpg system was found in only five species (*E. coli*, *Raoultella spp.* and *Enterobacter sp*) with the strictest model.

Based on the reconstruction of the ancestral states of the phylogenetic tree of Kpg fimbrial gene cluster, we can estimate the evolutionary history of the system and reveal that this locus evolved fastly, probably by horizontal gene transfer. The absence of correlation between the phylogeny of the core genome and the phylogeny of the most conserved protein of the system, KpgC, was consistent with the ancestral states reconstruction, confirming the evolutionary scenario of acquisition of the system by horizontal gene transfer. The evolution of virulence factors is known to be driven by horizontal gene transfer in pathogens, allowing a high genome plasticity and a quick adaptation to a new environment (Juhas, 2015). It has notably been shown that evolution of fimbrial gene clusters by horizontal gene transfer in *Salmonella* species results in the creation of an unique combination of fimbrial operon among *Salmonella* serotypes (Bäumler et al., 1997). Acquisition of specific fimbriae by these serotypes is likely to be one of the mechanisms facilitating the colonization of largest host range and various environmental sites by the bacteria (Bäumler, 1997; Cheng and Wiedmann, 2021).

The genetic organization of the Kpg system in *Klebsiella* genomes was commonly composed of the four *kpgABCD* genes followed by extra *kpgABC* genes on the complementary strand. However, this genomic architecture was highly variable between *Klebsiella* species (Figure 40). No relevant association between the organization of the Kpg systems and *Klebsiella* genomes with specific virulence and resistance has been shown, except for one organization with two homologues of *kpgB* and *kpgC* genes (in 3 genomes). However, the presence in the dataset of many genomes of the same specie, *Klebsiella pneumoniae*, could biase these results, and it would be relevant to analyze a larger dataset to avoid problems of phylogenetic inertia.

As the Kpg system was identified using bioinformatic tools, we next assessed the expression of the operon when the bacteria were grown *in vitro* in laboratory conditions. As observed for other CU systems, *kpgA* showed low basal expression level and KpgA was only detected when the expression of the operon was artificially induced (Humphries et al., 2003; Low et al., 2006). Indeed, by overexpressing the *kpgABCD* operon from the recombinant plasmid pBAD24\_ *kpgA*::HA, we were able to detect the chimeric KpgA-HA protein in membrane extracts from both an heterologous *E. coli* strain and the isogenic  $\Delta kpgABCD$  *K. pneumoniae* mutant. KpgA is thus likely to be surface exposed. Even if we have not been able to detect any fimbrial organization by transmission electronic microscopy, it could possibly serve as an adhesive surface structure.

Like the Fim and the *E. coli* common pilus (ECP) CU systems, the Kpg system belongs to the  $\gamma 1$  subclade and shares a similar genomic organization with these counterparts (Garnett et al., 2012; Khater et al., 2015). Several CU fimbrial systems, notably of the  $\gamma 1$  subclade, have been reported to be involved in adherence and colonization processes of *K. pneumoniae* (Khater et al., 2015; Stahlhut et al., 2012; Struve et al., 2009; Wu et al., 2010). Especially, the Kpg system was shown to be involved in mice intestinal colonization since an usher  $\Delta kpgC$  deficient mutant was unable to persist in the intestine tractus. Therefore, we wondered if the Kpg system plays a role in the ability of *K. pneumoniae* CH1476 strain to attach to eucaryotic cells. A mutant deficient for the complete operon *kpgABCD* did not show any difference compared to the wild-type strain in this capacity to adhere to intestinal cell line. These results were unexpected since a mutant deficient for the usher-encoding gene *kpgC* previously constructed in *K. pneumoniae* LM21 strain was attenuated in its capacities to adhere to Int-407 intestinal cell line (Khater et al., 2015). The phenotypical differences observed between the two mutant strains ( $\Delta kpgABCD$  versus  $\Delta kpgC$ ) could result from potential differences in the regulatory mechanisms of their respective background strains. Such phenomenon has already been observed with the type 1 fimbriae encoding operon in *E. coli* and *K. pneumoniae* strains. The extra *fimK* gene specifically presents in the *K. pneumoniae* *fim* operon strongly represses the expression of the type 1 fimbriae in urinary tract, whereas it did not occur in UPEC strains that lack an extra *fimK* gene (Joseph et al., 2021; Rosen et al., 2008b).

The ability of the  $\Delta kpgABCD$  mutant to form biofilm was also investigated in an *in vitro* model. Many *K. pneumoniae* CU fimbriae have been reported to play a role in biofilm formation, in particular the Mrk fimbriae (Murphy and Clegg, 2012; Schroll et al., 2010; Wilksch et al., 2011), but also the Kpc fimbriae (NTUH-K2044 strain), the Kpi fimbriae (Kp3380 strain) as well as the type 1 fimbriae (Gato et al., 2020; Schroll et al., 2010; Wu et al., 2010). In this study, no difference in biofilm formation was observed between the wild-type strain and the  $\Delta kpgABCD$  mutant. However, a much larger biomass was detected with the WT strain when grown in the presence of 0.2% bile salts compared to that

observed in LB alone, whereas no difference was detected between the two conditions when measuring the CFU counts. No such data were observed with the  $\Delta kpgABCD$  mutant, indicating that the larger biomass observed in the presence of bile salts was likely due to an increase in the biofilm matrix somehow linked to the expression of the *kpgABCD* operon. The expression of the four genes of the *kpgABCD* operon was investigated by RT-qPCR and revealed no surexpression of the four genes in the presence of bile salts (data not shown), suggesting that the promoting effect of bile does not ensue from a regulatory effect on production of the Kpg proteins. The interference of bile salts in biofilm formation has already been described in several models. Similarly to our results, Chen *et al.* showed that the addition *in vitro* of bile salts significantly increase biofilm formation by *K. pneumoniae*. A mutant  $\Delta pgaC$ , deficient for poly- $\beta$ -linked N-acetylglucosamine (PNAG) production, is not affected in biofilm formation in LB condition but prevent the enhancement of biofilm formation in present of bile salts. Furthermore, the  $\Delta pgaC$  mutant is attenuated during murine intestine colonization. As bile salts components are present in the human intestine, the stimulation of biofilm formation by bile salts could contribute to bacterial colonization of this site (Chen *et al.*, 2014)Chen *et al.*, 2014). Other pathogen display biofilm formation enhancement in the presence of bile. For example, *Vibrio cholerae* biofilm biomass production showed to be induced by bile acids. This enhancement of biofilm biomass would be dependent of a post-translational activation of VpsR (activator of vps genes) that upregulated the vps genes involved in polysaccharides synthesis (Hung *et al.*, 2006).

In conclusion, we have provided new elements on the characterization of a novel CU system of *K. pneumoniae*, the KpgABCD system. Our findings highlighted the prevalence of the Kpg system in *Klebsiella* genus and that its acquisition results likely from horizontal gene transfers. We also showed that Kpg would have a role for biofilm formation in the presence of bile, even though we were not able to understand the underlying molecular mechanisms. CU fimbrial systems mediate complex host-pathogen interactions and surfaces colonization. A better characterization of the role of the different fimbriae expressed by *K. pneumoniae* clinical strains will permit to improve the understanding of host and tissue tropism as well as full process of infection (Cheng and Wiedmann, 2021).

## Methods

**Data Genomes.** We analysed 14364 chromosomes and 11806 plasmids of 13514 bacterial fully sequenced genomes from NCBI RefSeq (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/>, downloaded in April 2019). This accounts for 4232 different species. From these sequences, we further analysed the 427 genomes corresponding to the *Klebsiella* genus. Species assignation was corrected using Kleborate (Lam *et al.*, 2020). A total of 414 *Klebsiella* species were assigned with a strong level of confidence, and only 10

were assigned with a weak confidence level. Three strains were discarded due to wrongful genus assignation.

**Identification of Kpg system.** To identify Kpg systems, MacSyFinder (Abby et al., 2014), a program to model and to detect macromolecular systems, was used. As input, it requires a proteome, a set of hidden Markov models (HMM) protein profiles and a model describing the number of components and their genetic organization. *Model.* a model for the Kpg system based on the information obtained from strain CH1157 was built. We specified that all the four proteins (KpgA, KpgB, KpgC, KpgD) were mandatory (biologically essential components for a putative functional system), and all are required to consider the system as complete. This is controlled by the option *min\_mandatory\_genes\_required*. Additionally, we specified that components should be encoded in a single locus and we limited the maximal distance between consecutive elements to one. Models were written in plain text, using a specific XML grammar, and can be modified by the user (see [27–30] for details). *Definition of HMM profiles.* We followed two distinct strategies: (i) HMM profiles from PFAM database. We searched the PFAM 28.0 database (<http://pfam.xfam.org>, last accessed October 2020) (Sonnhammer et al., 1997) for all four Kpg proteins. We downloaded ten randomly chosen proteins with the same architecture but ensuring that at least one protein belonged to the *Klebsiella* genus (listed in table S2b). Proteins were aligned with MAFFT v7.222 (Katoh and Standley, 2013; Katoh et al., 2002) using the L-INS-i option and 1000 cycles of iterative refinement. The HMM profiles were then built using hmmbuild (defaults parameters) from the HMMER package v3.1b2 (Finn et al., 2011). Since no PFAM protein family matched KpgD, a specific profile was built for this study. (ii). HMM profiles built for this study. BLASTP v 2.2.28 (McGinnis and Madden, 2004) with an e-value  $< 1^{-50}$  or  $< 1^{-80}$  (see below) was used to search for homologs among complete genomes. To reduce the redundancy of the dataset (*i.e.* to remove very closely related proteins), an all-against-all BLASTP v 2.2.28 analysis was performed, and the proteins with at least 80% sequence similarity were clustered using SiLiX v1.2.11 (<http://lbbe.univ-lyon1.fr/SiLiX>, default settings)(Miele et al., 2011). From each family, the longest sequence was selected as a representative. The set of representative sequences was then used to produce a multiple alignment with MAFFT v7.222 (Katoh and Standley, 2013; Katoh et al., 2002) using the L-INS-i option and 1000 cycles of iterative refinement. All HMM profiles were then built from the trimmed alignment using hmmbuild (defaults parameters) from the HMMER package v3.1b2 (Finn et al., 2011). *Detection.* MacSyFinder identifies the individual components of each Kpg system using hmmsearch from the HMMER package v3.1b2. A range of parameters (e-value and alignment coverage) was tested to retain



a specific component. They were named as follows, from the most permissive to the most stringent, E5COV50, Pfam\_def, E20COV70, E80COV80 (see table S3 for details).

**Identification of the core genome.** We identified the core genome of the 182 genomes harboring a simple Kpg system, corresponding to one single match of each protein, belonging mostly to *E. coli*, *K. oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter hormaechi*, but also other *Enterobacter*, *Burkholderia cepacia*. A previously published methodology was followed (Touchon et al., 2014). Briefly, orthologs were identified as bidirectional best hits, using end-gap free global alignment, between the proteome of *K. pneumoniae* CR14 and each of the 181 other proteomes. Hits with less than 60% similarity in amino acid sequence or more than 20% difference in protein length were discarded. Genomic synteny was not taken into account. The core genome was defined as the intersection of pairwise lists of positional orthologs and consisted of 186 protein families.

The *Klebsiella* genus core genome of 427 strains, plus one *Cedecea* sp., was built as above, except that the list of orthologs for every pairwise comparison was curated to take into account the high conservation of gene neighborhood at this phylogenetic scale (Rocha, 2006). We defined positional orthologs as bidirectional best hits adjacent to at least four other pairs of bidirectional best hits within a neighbourhood of 10 genes (five genes upstream and five downstream). The core genome consisted of 695 protein families.

**Construction of phylogenetic trees.** To build the core-genome phylogenetic tree of the strains with a simple Kpg system, we aligned each core gene family at the amino acid level with MAFFT v7.222 (default options) (Kato and Standley, 2013), trimmed non-informative positions with BMGE v1.12 (default options and -t AA) (Crisuolo and Gribaldo, 2010), and concatenated the alignments. The tree of the concatenate was built using a total of 26840 informative sites with IQTREE v.1.5.3 under the best-fit model (LG+I+G4) (Nguyen et al., 2015) and the midpoint root was assigned by the R package *phangorn* v1.99.14. The *Klebsiella* genus tree of the concatenate was built using 19614 informative sites with IQTREE v.1.4.2 under the best-fit model (JTT+F+I+G4) and the options *-bb 1000 -wbtl*. The tree was rooted using the *Cedecea* sp. strain as an outgroup. The KpgC tree was constructed by aligning all proteins found in complete systems, using IQTREE v.1.4.2 under the best-fit model (JTT+F+G4).

**Robinsons-Foulds distance.** The RF distance is a measure of topological distance between trees. To calculate the distance, all pairwise comparisons of trees were performed and the polytomy was calculated with *dist.topo* function method=PH85 (Kuhner and Felsenstein, 1994; Penny and Hendy,

1985a; Robinson and Foulds, 1981) from ape package. This measure adds 1 for each difference between trees. Because some trees contained identical sequences that can mislead the results, the squared lengths of internal branches were also calculated (methods=score) (Penny and Hendy, 1985b).

**Ancestral state reconstruction.** The ancestral states of Kpg operon were inferred with PastML (v1.9.24) (Ishikawa et al., 2019) using the maximum-likelihood algorithm MPPA and the F81 model. From the 835 tree nodes, only 20 remained unresolved.

**Bacterial strains, plasmid and culture conditions.** Bacterial strains and plasmids used in this study are shown in Table S4. Lysogeny Broth (LB) medium was used for all the experiments. All bacterial strains are routinely grown at 37°C with shaking and conserved at -80°C in LB containing 15% glycerol. Antibiotics were added to the media at the appropriate concentration: ampicillin (50mg/ml) and spectinomycin (50mg/ml). For protein extraction, bacteria containing the pBAD24 plasmid were grown in LB medium with L-arabinose concentrations ranging from 0.01% to 0.2%. For growth curves, bacteria were grown in LB or LB supplemented with 0.2% bile salts at 37°C with shaking.

**Construction of isogenic mutant strain.** PCRs were performed using Phusion high-Fidelity DNA polymerase and TaKaRa LA Taq purchased from New England BioLabs and Takara Biotechnology Inc respectively. The *K. pneumoniae* CH1476 *kpgABCD* defective mutant was created by replacement of the *kpgABCD* operon by a kanamycin resistance encoding gene (Datsenko and Wanner, 2000). The resistance encoding gene was then excised from the mutant's genome using the pCP20 plasmid expressing the flippase recombinase. The correct deletion of the target genes was confirmed by PCR and sequencing using primers described in Table S5.

**Expression of HA-tagged major subunit fimbriae.** The Influenza hemagglutinin (HA) tag encoding sequenced was firstly inserted on the 3'-end of *kpgA* gene on the bacterial chromosome using the pKNG101 suicide vector. Briefly, a PCR fragment containing the HA-tagged *kpgA* gene flanked by about 500 bp of upstream and downstream region of *kpgA* was constructed by two steps PCR using primers listed in Table S5, and cloned into pKNG101 vector. The recombinant plasmid was then conjugated into *K. pneumoniae* CH1476, and the plasmid integration in the chromosome was selected with streptomycin resistance. A second recombination event allowing excision of the vector was done using the SacB counter-selective marker for sucrose sensitivity. The correct insertion of the HA-tag in the chromosome was verified by PCR and sequencing. The *K. pneumoniae* CH1476 encoding KpgA-HA on the chromosome was named *Kp-kpgA::HA*.

The *kpgABCD* operon was then amplified from the *Kp-kpgA::HA* strain using primers P5 and P6 (Table S5), and cloned under arabinose-inducible promoter into pBAD24 vector using Gibson assembly (New England Biolabs). Recombinant pBAD24*kpgA::HA* vector was transformed in *K. pneumoniae*  $\Delta$ *kpgABCD* mutant and in *E. coli* MG1655.

**Biofilm assays.** The ability of bacteria to form biofilm was assessed in static microplate model by crystal violet staining and bacterial counting. All experiments were performed in multiple biological and technical replicates. For crystal violet staining (Corning Costar 96-well “U” Bottom Non-Treated plate), wells were coated for 1 h at room temperature with 0.05% BSA in PBS, and then inoculated with  $10^7$  CFU of *K. pneumoniae* in 150  $\mu$ L of LB medium or LB with 0.2% of bile salts. After 24 h of incubation at 37°C under shaking (100 rpm), plates were washed two times with PBS and stained with 0.5% crystal violet for 15 min. Biofilm biomass was quantified at OD<sub>570nm</sub> after solubilization of crystal violet in glacial acetic acid.

For analysis of biofilm formation by CFU counting, 24-well plates (Falcon 24-well Flat Bottom) were coated as described above and inoculated with  $10^6$  CFU in LB medium or LB with 0.2% of bile salts. After 16 h of incubation at 37°C under shaking (100 rpm), wells were washed with PBS and adherent bacteria were resuspended in 0.5mL PBS by two times sonication (2x1min - Fisherbrand S-Series Unheated Ultrasonic Cleaning Bath) and homogenization by pipetting. Serial dilutions were then plate on LB agar and CFU were determined after overnight incubation at 37°C.

**Protein extraction and Western blotting analysis.** Proteins were extracted from 10 mL of 18h-old cultures of *K. pneumoniae* and cells were harvested by centrifugation for 10 min at 6000g. For total proteins extraction, bacterial pellet was resuspended in TBS lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.4 with 150mM NaCl) supplemented with 1X protease inhibitor (Thermo Fisher Scientific) and added in Precellys® tubes filled with glass beads. The samples were lysed at 6000 rpm for 3 cycles (each cycle lasting for 15s, with 20s rest in between cycles), and the resultant lysate was centrifuged for 5 min at 6000 g in order to recover total protein extracts in supernatant. For membrane protein extractions, bacterial pellet was washed one time in TE buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.4 with 1mM EDTA) before being lysed as describe for total protein. The resulting samples were centrifuged for 15 min at 1200 g to discard cells debris and supernatant was then ultracentrifuged at 80000 g for 1 h at 4°C. Pellet, containing membrane proteins, was then resuspended in 1 mL of TBS buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.4 with 150mM NaCl) supplemented with 1X protease inhibitor (Thermo Fisher Scientific). All proteins quantification was performed with Bradford protein assay (BioRad) reagent according to the

manufacturer's recommendations. Samples containing 10 µg of total protein, or 10 µg of membrane protein were analyzed by Western blotting according to the instructions of the TGX stain-free FastCast kit (BioRad) and with an anti-HA monoclonal antibody (Cell Signaling). Blot was revealed with Clarity Western ECL reagent on ChemiDoc XRS+ imaging system (Reagents and Detection system from BioRad).

**Cells adhesion assays.** Intestine 407 (Int-407) cells derived from human embryonic intestinal epithelium were cultured in Minimum Essential Medium with stable Glutamine (MEM - Dominique Dutscher) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (Dominique Dutscher). The cells were maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. For adhesion assays, 24-wells tissue plates (Corning-Falcon, Dominique Dutscher) were seeded with 5.10<sup>5</sup> cells per wells. Int-407 cells were incubated 24 h to achieve 80% confluence prior to the infection. Monolayers were infected at a multiplicity of infection of 10 bacteria per cell. After 3h of incubation at 37°C, cells were washed three times with sterile PBS and were lysed with Triton 1%. Suspensions were homogenized and serial dilution were plated onto LB agar for CFU counting. Adhesion assays were conducted in biological and technical triplicate over three to five successive passages of Int-407 cells.

## Supplementary data

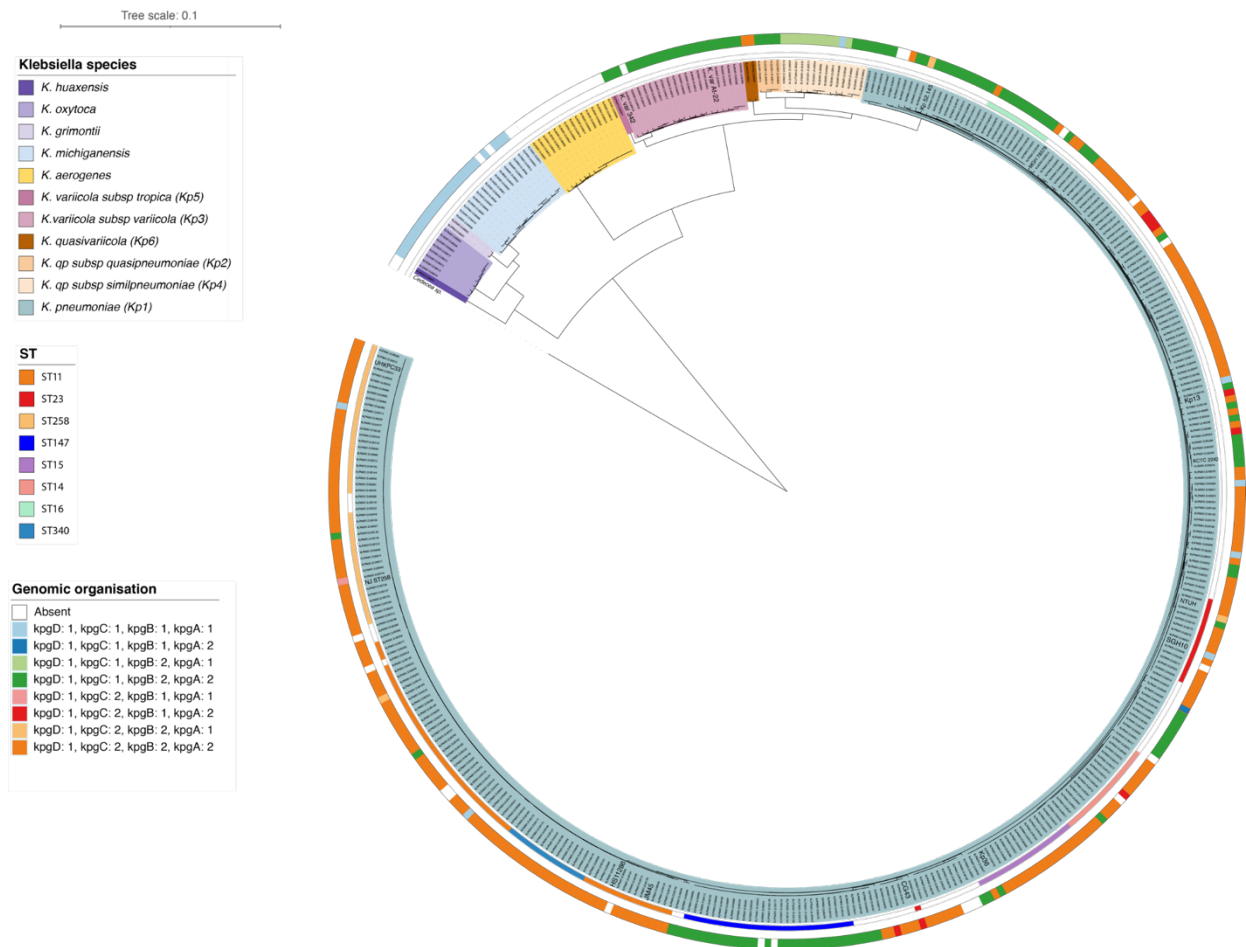


Figure S1: **Phylogenetic tree of the 423 *Klebsiella* strains analysed in this study.** The tree was built using the protein sequences of the 627 families of the core genome of *Klebsiella* spp. The genome of one *Cedecea* strain was used to root the tree. The genomic organization of the Kpg systems is indicated by the outer circle. The inner circle indicates the “sequence types” (STs) of the strains, as determined by Kleborate. The tree was generated using iTOL. Only STs with more than ten associated genomes are indicated. Some *Klebsiella* reference strains are indicated in the tree by their name.

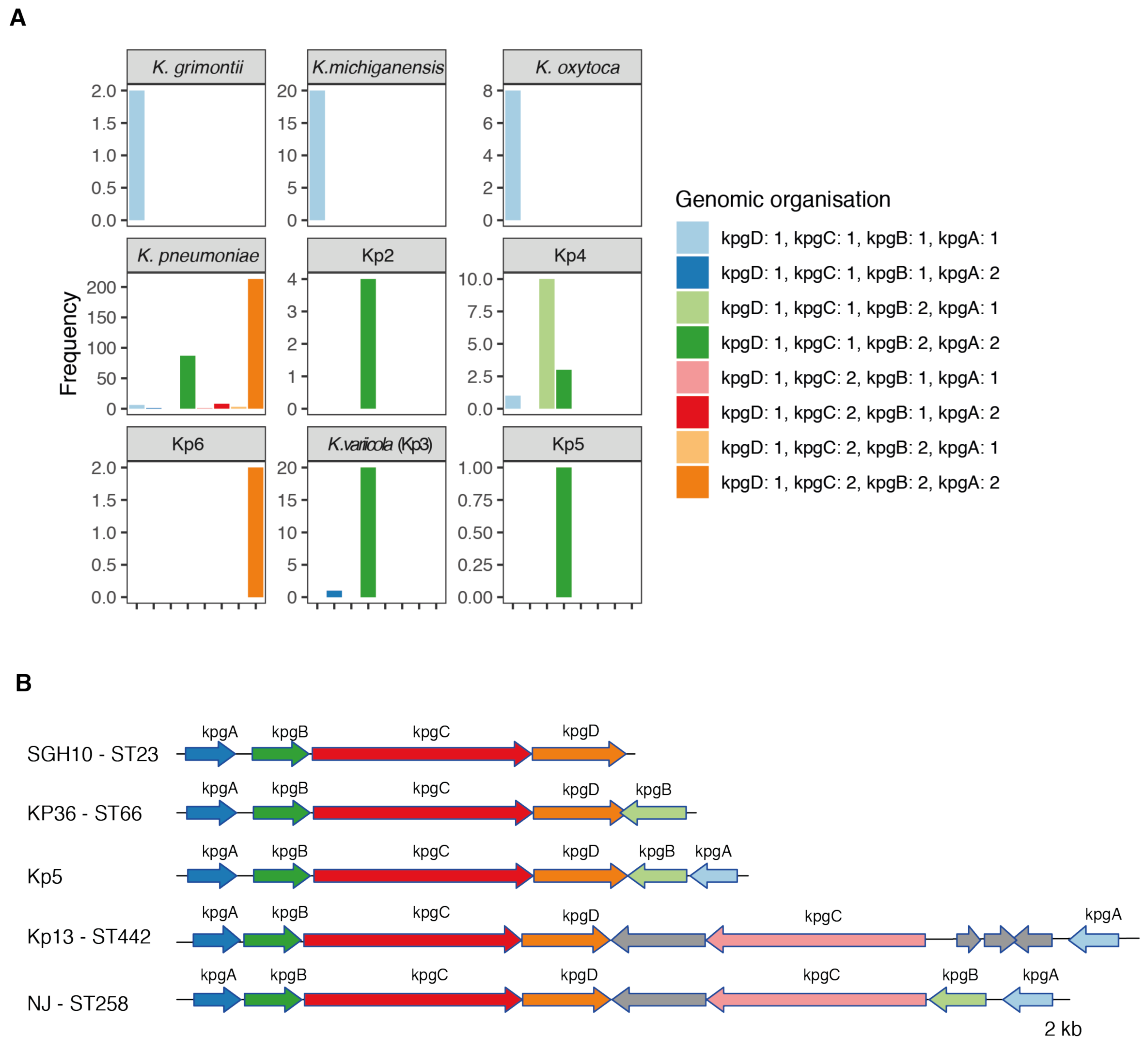


Figure S2: **Genomic organization of Kpg systems.** **A.** The graph indicates the number of occurrences of each of the different organizations. **B.** Schematic representation of the Kpg system in several *Klebsiella* reference strains. The graphic representation was produced with R library *genoplots*.

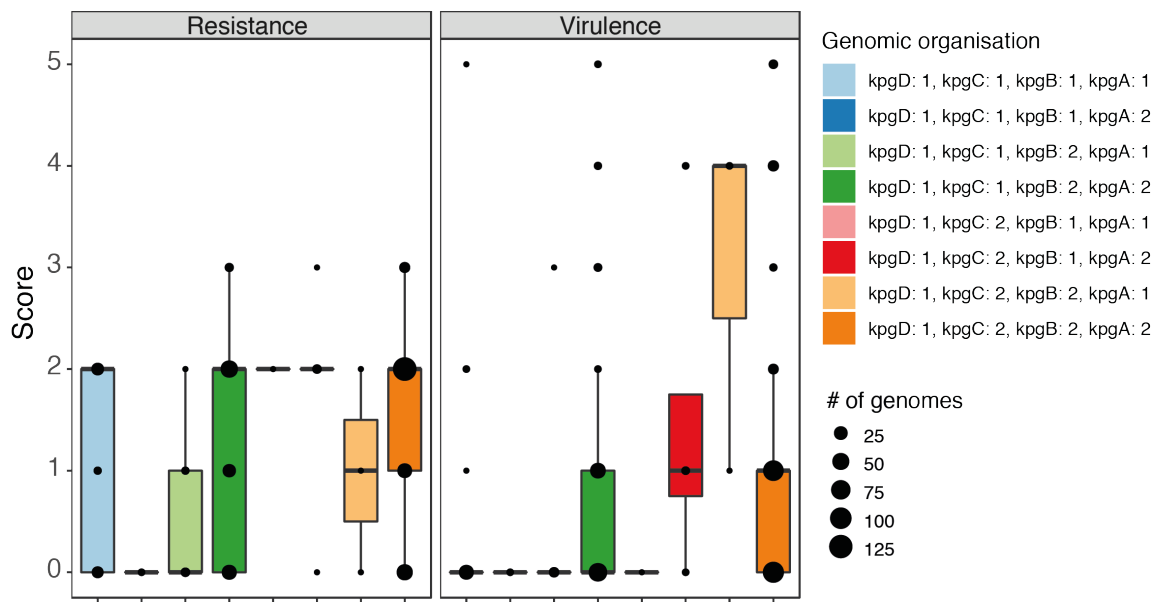


Figure S3: Resistance and virulence score calculated for each genome. The size of points represents the amount of genomes

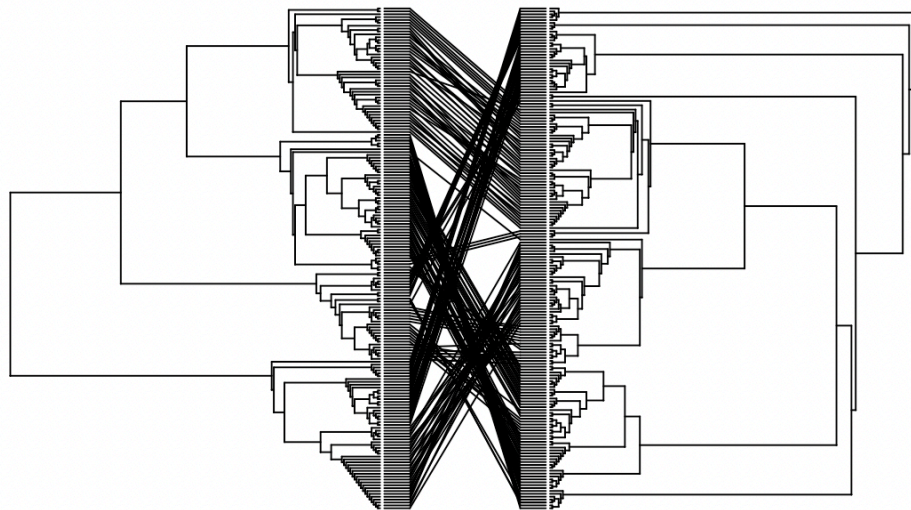


Figure S4: Comparison of the core genome phylogenetic tree with the *kpgABCD* operon phylogenetic tree. Core genome phylogenetic tree is represented on the left. *kpgABCD* operon phylogenetic tree is represented on the right.

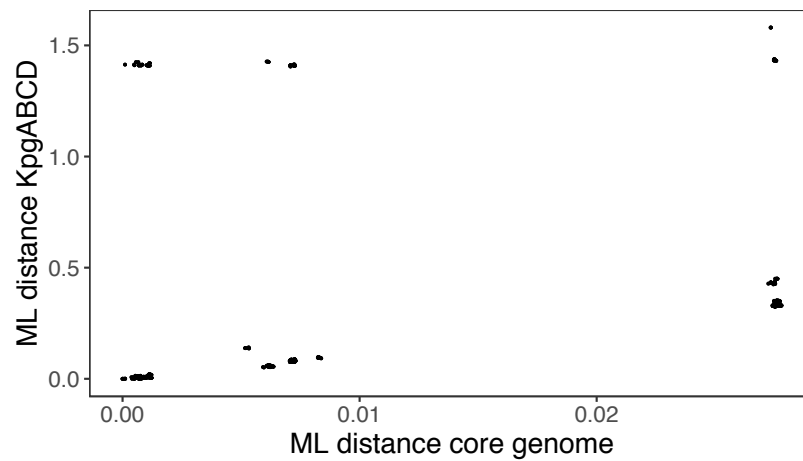


Figure S5: **Correlation between the maximum likelihood distances between core genome and all canonical KpgABCD phylogenies.** The concatenated alignment of KpgABCD was used for the construction of the phylogeny.

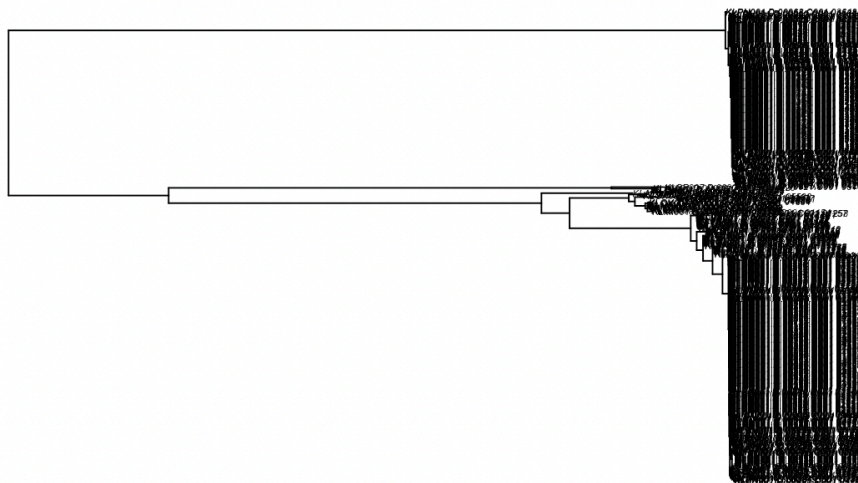


Figure S6: **Phylogenetic tree of the KpgC protein from the conserved operon *kpgABCD* in Klebsiella genus.** Two different clades of KpgG are identifiable: one corresponding to the bona fide KpgC of the *kpgABCD* operon, and another with extra KpgC downstream of the operon.



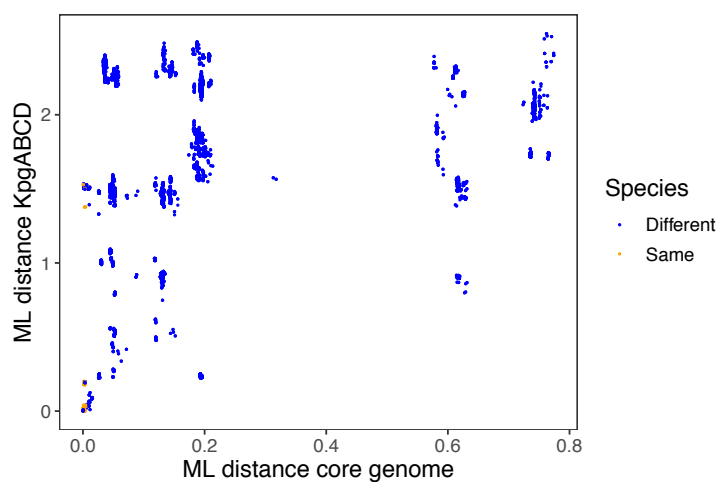


Figure S7: Correlation between the maximum likelihood distances between core genome and KpgABCD phylogenies between pairs of genomes from genus other than *Klebsiella*.

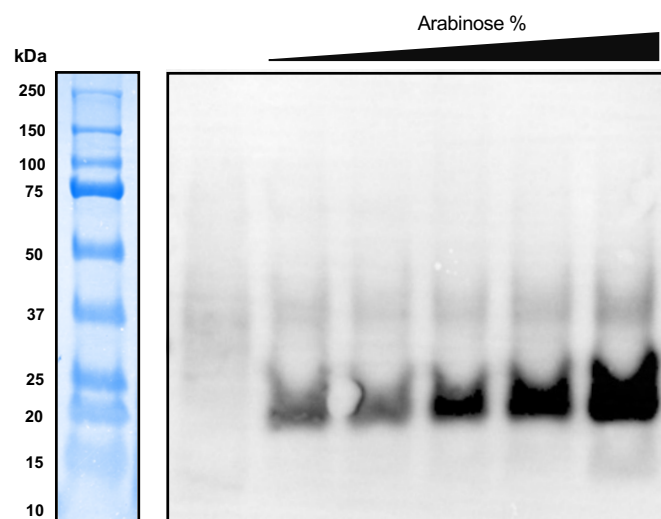


Figure S8: **KpgA** expression in *Escherichia coli*. Total protein extracts from *E. coli* MG1655 harboring pBAD24\_ *kpgA*::HA were analyzed by Western blotting with an anti-HA antibody. Bacteria were growth in LB medium with 6 different arabinose concentrations (0%, 0.02%, 0.1% and 0.2%). Ladder was represented after Coomassie staining. Expected KpgA protein size was indicated with black arrow.

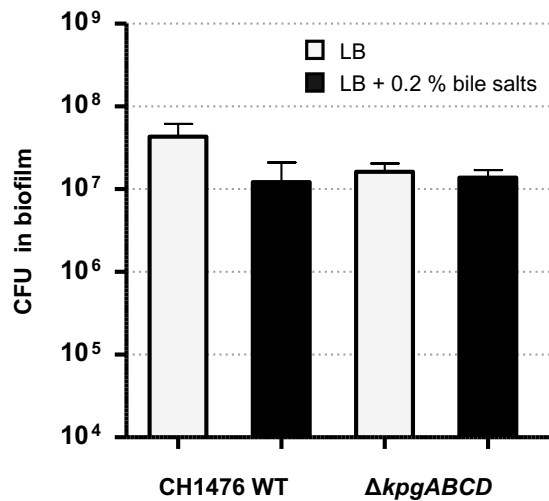


Figure S9: **Determination of biofilm biomass by CFU counting.** Biofilm of *K. pneumoniae* CH1476 wild-type and  $\Delta kpgABCD$  mutant strains were formed in LB media supplemented or not with 0.2% bile salts and incubated for 16h at 37°C. Biomass was determined by CFU counting of adherent bacteria. Results are expressed as CFU number in biofilm.

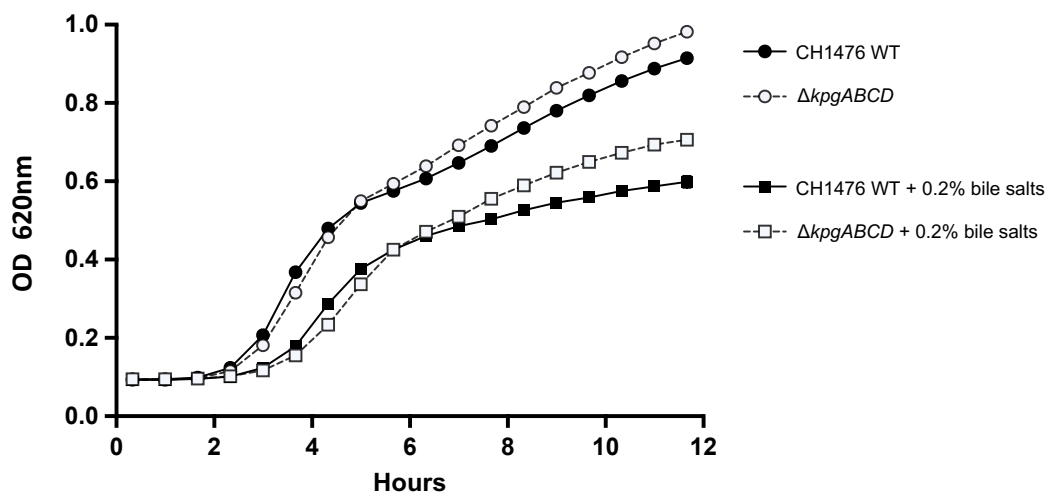


Figure S10: **Growth curves of *K. pneumoniae* CH1476 wild type and  $\Delta kpgABCD$  mutant strains in LB media supplemented or not with 0.2% bile salts.**

**Table S2a:** PFAM profiles of KpgA, KpgB and KpgC proteins.

Protein			
KpgA	PF00419.21 (Fimbrial domain)		
KpgB	PF00345 (chaperone N terminal)	PF02753.17 (chaperone C terminal)	
KpgC	PF13954 (PapC N terminal)	PF00577 (usher)	PF13953 (PapC C terminal)

**Table S2b:** Accession numbers and details from PFAM database proteins selected to build HMM profiles, based on their matching architectures to KpgB and KpgC.

## I. KpgB

Accession	Strain	Description	Other IDs
<a href="#">A6TH61_KLEP7</a>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (strain ATCC 700721 / MGH 78578)	Periplasmic chaperone, required for type 1 fimbriae (228 residues)	ECO:0000313 EMBL:ABR79895.1
<a href="#">A8AF46_CITK8</a>	<i>Citrobacter koseri</i> (strain ATCC BAA-895 / CDC 4225-83 / SGSC4696)	Uncharacterized protein (233 residues)	ECO:0000313 EMBL:ABV12109.1
<a href="#">A4W7J3_ENT38</a>	<i>Enterobacter</i> sp. (strain 638)	Pili assembly chaperone (230 residues)	ECO:0000313 EMBL:ABP59673.1
<a href="#">A0A3N1IV26_9ENTR</a>	<i>Enterobacter</i> sp. BIGb0383	Chaperone protein PapD (239 residues)	ECO:0000313 EMBL:ROP58352.1
<a href="#">A0A447MAS7_SALBN</a>	<i>Salmonella bongori</i>	Fimbrial chaperone (228 residues)	ECO:0000313 EMBL:VDZ81012.1
<a href="#">B2VEW6_ERWT9</a>	<i>Erwinia tasmaniensis</i> (strain DSM 17950 / CIP 109463 / Et1/99)]	Type I fimbrial chaperone (234 residues)	ECO:0000313 EMBL:CAO97913.1
<a href="#">A0A443IAL2_9GAMM</a>	<i>Pantoea</i> sp. LMG 27579	Pilus assembly protein PapD (232 residues)	ECO:0000313 EMBL:RWR09937.1
<a href="#">A0A378EEM9_KLEPR</a>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	Pili assembly chaperone (233 residues)	ECO:0000313 EMBL:STW13390.1
<a href="#">A0A377Z6L6_KLEPO</a>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	Chaperone protein fimC (220 residues)	ECO:0000313 EMBL:STU63031.1
<a href="#">A0A318W2T3_9ENTR</a>	<i>Citrobacter</i> sp. YR018	Fimbrial chaperone protein (230 residues)	ECO:0000313 EMBL:PYG19733.1

## II. KpgC

Accession	Strain	Description	Other IDs
<a href="#">A0A097R874_HAFAL</a>	<i>Hafnia alvei</i> FB1	Fork-head domain-containing protein (840 residues)	ECO:0000259 PROSITE:PS50039
<a href="#">A6T559_KLEP7</a>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (strain ATCC 700721 / MGH 78578)	Putative fimbrial usher (827 residues)	ECO:0000313 EMBL:ABR75730.1
<a href="#">A0A0V9JQQ4_9ENTR</a>	<i>Citrobacter</i> sp. 50677481	Fimbrial assembly protein (825 residues)	ECO:0000313 EMBL:KSY30780.1
<a href="#">A0A378E9T0_KLEPR</a>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	Putative fimbrial biogenesis outer membrane usher protein (847 residues)	ECO:0000313 EMBL:STW11822.1
<a href="#">A0A370R1N5_9ENTR</a>	<i>Enterobacillus tribolii</i>	Outer membrane usher protein (873 residues)	ECO:0000313 EMBL:RDK95822.1
<a href="#">A0A0N9W1W8_9GAMM</a>	<i>Acinetobacter equi</i>	Uncharacterized protein (814 residues)	ECO:0000313 EMBL:ALH95496.1
<a href="#">A0A0N0IAD2_9GAMM</a>	<i>Moellerella wisconsensis</i> ATCC 35017	Fimbrial usher protein (837 residues)	ECO:0000313 EMBL:KPD02933.1
<a href="#">A0A0L7T1K6_9GAMM</a>	<i>Erwinia iniecta</i>	Fimbrial assembly protein (833 residues)	ECO:0000313 EMBL:KOC89319.1
<a href="#">A0A0J6RBN4_9NEIS</a>	<i>Chromobacterium</i> sp. LK11	Uncharacterized protein (832 residues)	ECO:0000313 EMBL:KMN80066.1
<a href="#">A0A0A2VU56_BEABA</a>	<i>Beauveria bassiana</i> D1-5	Outer membrane usher protein fimD (841 residues)	ECO:0000313 EMBL:KGQ11138.1

**Table S3:** Details of the different detection models used in this study.

	BLASTP evalue	HMM Coverage (%)	HMM e-value	# Kpg systems in <i>Klebsiella</i>	# Kpg systems in other genus
E5COV50	1e <sup>-50</sup>	50	1e <sup>-5</sup>	387	156
Pfam_def		50	1e <sup>-3</sup>	387	95
E20COV70	1e <sup>-80</sup>	70	1e <sup>-20</sup>	385	81
E80COV80	1e <sup>-80</sup>	80	1e <sup>-80</sup>	378	12

**Table S4:** Strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Description	Antibiotic resistances	Collection number	Source
<b>Strains</b>				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				
<i>Kp</i> -Ap <sup>R</sup>	<i>K. pneumoniae</i> clinicate isolate	Ap	CH1157	
<i>Kp</i> -Sp <sup>R</sup>	Wild-type strain, CH1157 $\Delta$ shv::aadA7	Sp	CH1476	This study
$\Delta$ kpgABCD-Km <sup>S</sup>	<i>Kp</i> -Sp <sup>R</sup> $\Delta$ kpgABCD	Sp	CH1757	This study
<i>Kp</i> -kpgA::HA	<i>Kp</i> -Ap <sup>R</sup> with an HA tag fused on the <i>kpgA</i> gene	Sp	CH1627	This study
$\Delta$ kpgABCD pBAD24_ <i>kpgA</i> ::HA	<i>Kp</i> -Sp <sup>R</sup> $\Delta$ kpgABCD with plasmid pBAD24 <i>kpgA</i> ::HA	Sp, Ap	CH1633	This study
<i>Escherichia coli</i> K-12				
MG1655 pBAD24_ <i>kpgA</i> ::HA	Plasmid with insertion <i>kpgABCD</i> operon with HA tag fused to the <i>kpgA</i> gene and placed under control of the pBAD promoter arabinose-inducible		CH1630	This study
<b>Plasmids</b>				
pKD4	Plasmid with FRT-flanked kanamycin-resistance cassette used for kanamycin cassette amplification, Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	Km, Ap		(Datsenko & Wanner, 2000)
pKOBEG199	Plasmid encoding Lambda Red recombinase protein, Tc <sup>R</sup>	Tc		(Chaveroche & Ghigo, 2000)
pCP20	Plasmid with the yeast recombinase gene (FLP, aka <i>exo</i> ), chloramphenicol and ampicillin resistant gene and temperature sensitive replication, Cm <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	Cm, Ap		(Cherepanov & Wackernagel, 1995)
pKNG101	Suicide vector for allelic exchanges, <i>oriR6K</i> , <i>sacB</i> , StR	St		
pBAD24	Plasmid for bacterial expression with L-arabinose inducible promoter, <i>araC</i> , <i>pMB1 ori</i> , Ap <sup>R</sup>	Ap		

Ap: Ampicilin, Sp: Spectinomycin, Km: Kanamycin, Tc: Tetracyclin, Cm: Chloramphenicol

**Table S5:** Primers used in this study

Number	Primers Name	Oligonucleotide sequence (5'>3')	PCR product size (bp)	Use
P1	1476_kpg-KmFRT-Fw	TTTTCTTCTGTTTATTTCATGGCCATCTATTGGCGAAATAAGGCAGAGTAG AGGGGGGTCTTGAGCGATTGTGTAGG	1615 pb	Amplification of kanamycin resistance encoding gene for $\Delta kpgABCD$ isogenic mutant construction in <i>Kp</i> CH1476
P2	1476_kpg-KmFRT-Rv	ACTACGGCGCGGTGGTGCCCATCCCCCTGCAGAATGCCCATGTGCCGCCCA GGCTAGTTTGGTCCATATGAATATCCTCC		
P3	1476_kpg-Fw	GCTCTGACGAGCGACAAT	2495 / 2017 pb	Verification of the presence of <i>kpgABCD</i> operon in <i>Kp</i> CH1476 by PCR and sequencing
P4	1476_kpg-Rv	TGCATATCACCTGGTCAAC		
P5	pBAD24_kpg-HA-Fw	GCTAGCAGGAGGAATTCACCATGAAAAACAACCTCGCTT	2000 pb	Amplification of <i>kpgABCD</i> operon with <i>kpgA</i> gene fused to HA tag for cloning into pBAD24 plasmid
P6	pBAD24_kpg-HA-Rv	TCTAGAGGATCCCCGGGTACCTAGTTATACTCCAGGGCGA		
P7	KmFRT-Fw	GTCTTGAGCGATTGTGTAGG	1495 pb	Verification of the absence of kanamycin cassette on the chromosome of $\Delta kpgABCD$ isogenic mutant
P8	KmFRT-Rv	TGGTCCATATGAATATCCTCC		
P9	pKNG101_kpgA-Fw	CCCCCTGCAGGTCGACGGATCCCAACTATCAATCCTGACTC	557 pb	Two-step PCR amplification to generate fragment containing <i>kpgA</i> gene fused to HA tag
P10	pKNG101_kpgA-HA-Rv	AGATCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGTTATAAATCATATTGAAAT TAGCTGT		
P11	pKNG101_kpgB-HA-Fw	TACCATACGATGTTCCAGATTACGCTTGATCTAATTGCGGTTATTCAGA	670 pb	
P12	pKNG101_kpgB-Rv	TACTTATGGTACCCGGGGATCCACCTGCAGCTTATTCACCTC		

Données complémentaires

## **Caractérisation du rôle de la pompe à efflux MdtJI de *Klebsiella pneumoniae***

Laura Joseph<sup>1</sup>, Sabine Favre-Bonte<sup>2</sup>, Christiane Forestier<sup>1</sup>, Damien Balestrino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, CNRS, LMGE, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>2</sup>Bacterial efflux and environmental resistance, Université de Lyon 1, UMR5557, Lyon, France

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, Université Clermont Auvergne, CNRS,  
F-63000 Clermont-Ferrand, France

Rôle de la pompe à efflux MdtJI de *K. pneumoniae* : avant-propos

La capacité à coloniser le tractus digestif de l'hôte et à former des biofilms sur les dispositifs médicaux sont des éléments clés de la pathogénicité de *Klebsiella pneumoniae*. Dans le cadre d'infections liées à la formation de biofilms, le processus de dispersion est d'une importance majeure car il permet la libération dans l'organisme de bactéries avec un pouvoir pathogène augmenté, comparativement aux formes planctoniques et sessiles, et notamment une capacité de colonisation accrue des surfaces abiotiques et biotiques (Guilhen et *al.*, 2019). Une analyse transcriptionnelle par un séquençage global des ARNs (RNAseq) des formes planctoniques, sessiles et « bactéries dispersées » d'une souche clinique de *K. pneumoniae* avait d'identifié des gènes surexprimés dans les bactéries dispersées par rapport à la condition biofilm. Notre hypothèse était que ces gènes pouvaient avoir un rôle dans le processus de la dispersion ou contribuer au phénotype des bactéries dispersées. Parmi les gènes surexprimés dans les bactéries dispersées, nous nous sommes intéressés à l'opéron *mdtJI* qui code une pompe à efflux de la famille des SMR. L'une des principales fonctions connues de cette pompe est l'excrétion de polyamines, des molécules reconnues comme des médiateurs essentiels de la virulence chez de nombreux genres bactériens (Di Martino et *al.*, 2003). Les systèmes d'efflux sont largement étudiés pour leur rôle dans la résistance aux molécules antimicrobiennes mais ils sont également impliqués dans des processus physiologiques dont la formation de biofilm, notamment via la sécrétion de composés de la matrice extracellulaire (Alav et *al.*, 2018).

Nous avons ainsi recherché quel était le rôle de la pompe à efflux MdtJI dans le phénotype associé aux bactéries dispersées, i.e. formation de biofilm et adhésion cellulaire accrues, résistance à la lyse par les macrophages. Pour cela, nous avons analysé les phénotypes d'un mutant isogénique déficient dans la pompe MdtJI comparativement à celui de la souche sauvage, et nous avons recherché quel(s) était(et) le(s) substrat(s) de la pompe MdtJI par un screening phénotypique. L'objectif était de déterminer si la pompe à efflux MdtJI joue un rôle dans l'expression de la pathogénicité de *K. pneumoniae*, en lien avec sa surexpression dans les bactéries dispersées de biofilm.



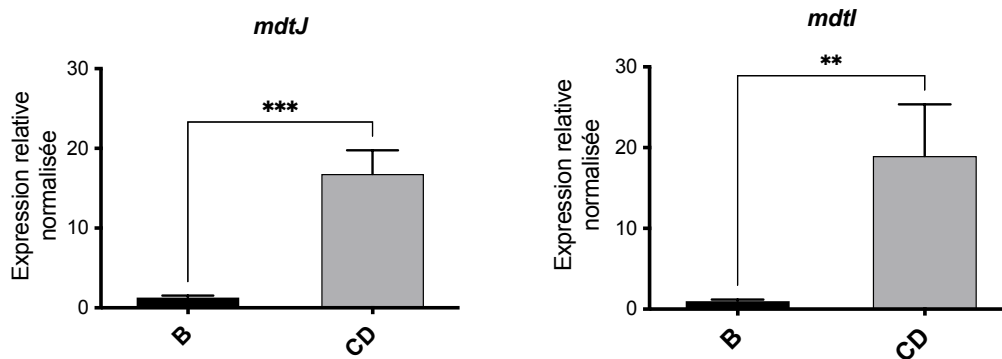


Figure 46 : **Expression différentielle des gènes de l'opéron *mdtJI***. L'expression des gènes *mdtJ* et *mdtI* dans les conditions « biofilm » (B) et « cellules dispersées » (CD) a été déterminée par RT-qPCR. Les valeurs d'expression sont normalisées par le gène de ménage *cpxR*, et sont exprimées par rapport à la condition « biofilm » normalisée à 1. Test de Mann-Whitney de comparaison de moyennes : \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ .

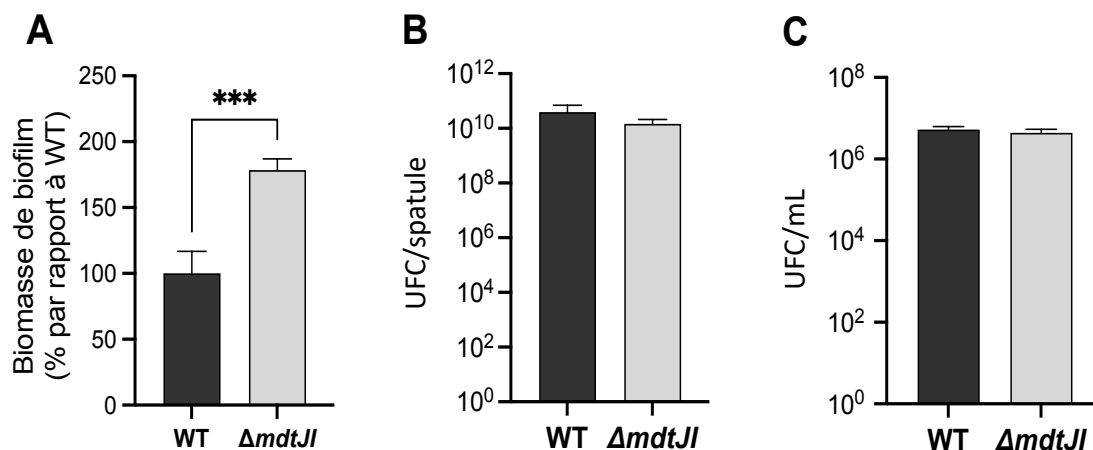


Figure 47 : **Formation de biofilm dans trois modèles expérimentaux**. La figure représente la formation de biofilm par le mutant isogénique  $\Delta mdtJI$  comparativement à la souche sauvage (WT) de *K. pneumoniae* CH1476. (A) La quantité de biomasse de biofilm formé pendant 5h à 37°C dans du milieu M63B1 a été déterminée par coloration au cristal violet dans un modèle de culture statique en microplaque polystyrène 96 puits. (B) Dans le modèle de culture en flux en microfermenteur, le nombre d'UFC adhérents à la spatule a été déterminé. (C) Dans le modèle de culture statique sur lamelle de verre, le nombre d'UFC a été déterminé. Test de Mann-Whitney de comparaison de moyennes : \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ .

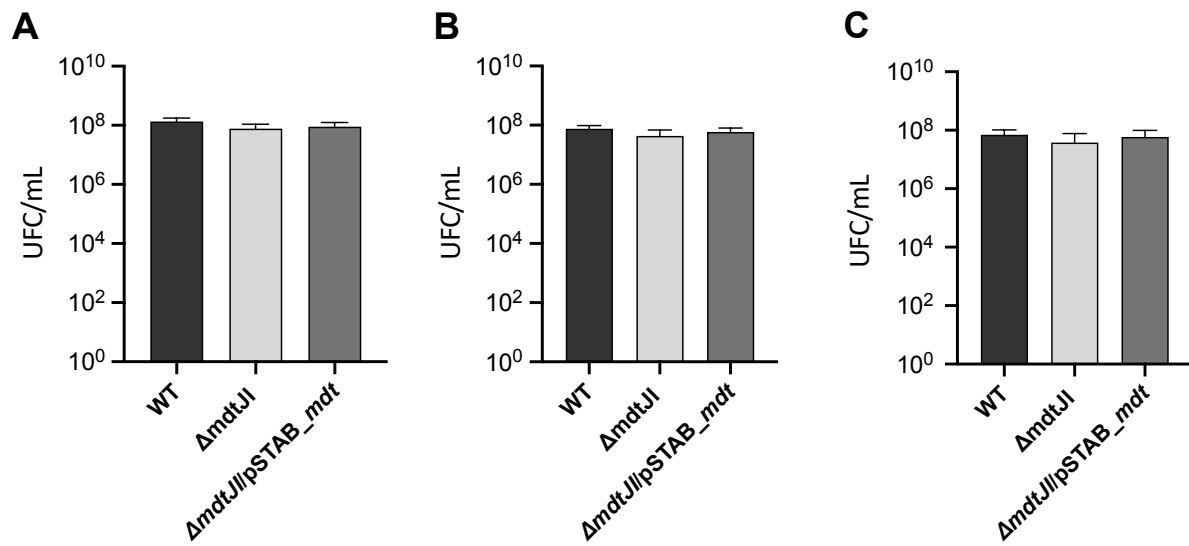


Figure 48 : **Comparaison de la solidité du biofilm.** Comparaison de la solidité des biofilms de la souche sauvage de *K. pneumoniae* CH1476, du mutant isogénique  $\Delta mdtII$  et du mutant transcomplémenté  $\Delta mdtII/pSTAB\_mdt$ . (A) Nombre d'UFC/mL dans le biofilm initial formé sur lamelle de verre en microplaques 24 puits après 5h d'incubation. (B) Nombre d'UFC/mL correspondant aux bactéries détachées dans le surnageant de culture après 1min30 de sonication. (C) Nombre d'UFC par mL dans le biofilm final après 1min30 de sonication. Test de Kruskal-Walis de comparaisons multiples : \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ .

## Résultats et commentaires

### Surexpression de l'opéron *mdtJI* par les bactéries dispersées issues de biofilm

Une analyse par RT-qPCR a montré des niveaux d'expression significativement plus élevés des gènes *mdtJ* et *mdtI* dans les cellules bactériennes dispersées de *K. pneumoniae* comparativement aux bactéries sessiles (Figure 46). Ces résultats, en cohérence avec ceux obtenus lors de l'analyse par RNA-seq (Guilhen et al., 2016), suggèrent un rôle potentiel de la pompe à efflux MdtJI dans les processus de dispersion, ainsi que dans la pathogénicité et la survie des bactéries quittant le biofilm.

### Rôle de la pompe à efflux dans la formation de biofilm

La capacité à former du biofilm de la souche de *K. pneumoniae* CH1476 sauvage et du mutant  $\Delta mdtJI$  a été évaluée dans 3 modèles expérimentaux. Dans le modèle en microplaque 96 puits, une augmentation significative d'un facteur 1,8 de la biomasse de biofilm formé a été observée avec le mutant  $\Delta mdtJI$  comparativement à la souche sauvage (Figure 47). Cette augmentation n'a pas été retrouvée dans les deux autres modèles expérimentaux (lamelle de verre en microplaque 24 puits ou en système en flux de microfermenteur) (Figure 47). Cette différence pourrait s'expliquer par la méthode de quantification du biofilm. La coloration au cristal violet utilisée dans la technique en microplaques 96 puits permet de quantifier les cellules bactériennes et la matrice qui les englobe, alors que les deux autres techniques mesurent exclusivement les cellules bactériennes viables. La différence liée à l'expression de la pompe à efflux MdtJI serait alors corrélée à la nature ou à la quantité de la matrice extracellulaire produite. Il est alors possible d'imaginer qu'il existe une relation de co-régulation entre le système d'efflux MdtJI et des systèmes impliqués directement ou indirectement dans la synthèse des composants de la matrice extracellulaire.

### Rôle de la pompe à efflux dans la solidité du biofilm

Les pompes à efflux pouvant faciliter l'agrégation des bactéries au sein du biofilm (Alav et al., 2018) et donc augmenter la cohésion des amas, nous avons évalué le rôle du système d'efflux MdtJI dans la solidité du biofilm formé par *K. pneumoniae*. La résistance au détachement sous l'effet de sonications était identique entre la souche sauvage, le mutant  $\Delta mdtJI$  et le mutant transcomplémenté  $\Delta mdtJI/pSTAB\_mdt$ , surexprimant la pompe à efflux MdtJI par rapport à la souche sauvage, dans ces conditions expérimentales (Figure 48). La pompe à efflux MdtJI ne semble donc pas avoir de rôle dans la solidité du biofilm de *K. pneumoniae*.

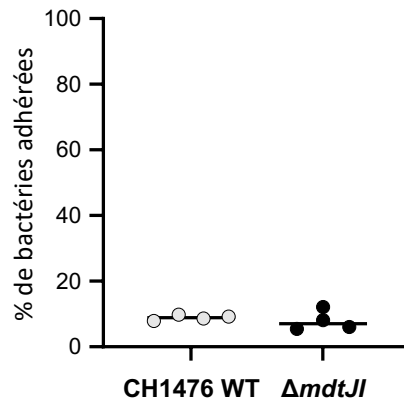


Figure 49 : **Adhésion bactérienne sur les cellules de la lignée épithéliale pulmonaire Calu-3.** Le pourcentage de bactéries adhérees par rapport à l'inoculum de *K. pneumoniae* CH1476 sauvage (WT) et de son mutant isogénique  $\Delta mdtJI$  sont représentés par des ronds blancs et noirs respectivement. La valeur médiane est représentée par la ligne noire. Les données de quatre expériences indépendantes sont présentées. Test de Mann-Whitney de comparaison de moyennes : \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ .

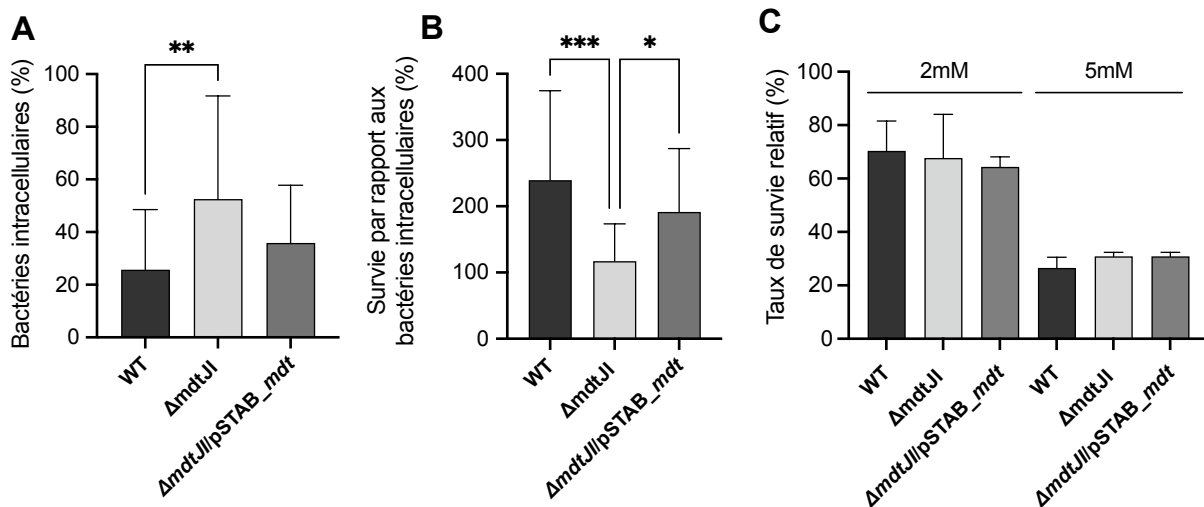


Figure 50 : **Résistance en macrophages et au stress oxydatif.** Les figures représentent le niveau de phagocytose et la capacité de résistance en macrophage, et la résistance au peroxyde d'hydrogène de la souche sauvage *K. pneumoniae* CH1476, du mutant  $\Delta mdtJI$  et du transcomplément  $\Delta mdtJI/pSTAB\_mdt$ . (A) Le taux de phagocytose des bactéries, après 30 min de contact avec les macrophages J774, est exprimé en % par rapport à l'inoculum. (B) La survie des bactéries après phagocytose est exprimée en % du nombre de bactéries viables après 24h de contact avec les macrophages J774 par rapport au nombre de bactéries internalisées (C) La survie des bactéries en présence de peroxyde d'hydrogène à deux concentrations (2mM et 5mM) est exprimée en % du nombre de bactéries viable après 1h30 de traitement par rapport au nombre de bactéries dans la condition contrôle sans traitement. Test de Kruskal-Wallis de comparaisons multiples : \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ .

### Rôle de la pompe à efflux dans le processus de colonisation du tissu de l'hôte

Parce que les pompes à efflux sont susceptibles d'intervenir dans les processus de colonisation des tissus, nous avons examiné le rôle de la pompe MdtJI dans la colonisation *in vitro* de cellules épithéliales pulmonaires de la lignée cellulaire Calu-3. Après 3h d'infection, aucune différence d'adhésion n'a été observée entre les deux souches (Figure 49). La pompe à efflux MdtJI ne semble donc pas favoriser l'adhésion aux cellules pulmonaires *in vitro*. Néanmoins, ce système d'efflux pourrait jouer un rôle dans l'adhésion à d'autres types cellulaires.

### Rôle de la pompe à efflux dans les processus de résistance aux stress

Les pompes à efflux sont également décrites chez les bactéries pour jouer un rôle dans la résistance aux antibiotiques, l'excrétion de diverses molécules antimicrobiennes, voire plus généralement la résistance à des stress y compris lors des processus de phagocytose. Le taux de phagocytose et la capacité de survie/multiplication dans des macrophages de la souche sauvage de *K. pneumoniae*, du mutant  $\Delta mdtJI$  et du mutant complémenté  $\Delta mdtJI/pSTAB\_mdt$  ont été évalués *in vitro*. La phagocytose du mutant  $\Delta mdtJI$  est significativement plus élevée que celle de la souche sauvage *K. pneumoniae* CH1476 (Figure 50A). Le mutant transcomplémenté  $\Delta mdtJI/pSTAB\_mdt$  est phagocyté de façon moins importante que le mutant  $\Delta mdtJI$ , mais la différence est non significative. Nous avons également montré que le mutant  $\Delta mdtJI$  présente une capacité de survie/multiplication significativement plus faible que celles de la souches sauvage *K. pneumoniae* CH1476 et du mutant complémenté  $\Delta mdtJI/pSTAB\_mdt$  (Figure 50B). La pompe à efflux MdtJI pourrait donc jouer un rôle dans la résistance au stress oxydatif au sein des macrophages et ainsi contribuer à la multiplication intracellulaire des bactéries. Pour vérifier cette hypothèse, la souche sauvage *K. pneumoniae* CH1476 et le mutant  $\Delta mdtJI$  ont été soumis à des concentrations croissantes de peroxyde d'hydrogène : aucune différence n'a été observée entre les deux souches (Figure 50C). La survie augmentée observée en macrophages ne résulterait pas d'une résistance augmentée au stress oxydatif conférée par la présence de la pompe à efflux MdtJI mais serait liée à un autre mécanisme impliquant la pompe à efflux. La phagocytose augmentée du mutant  $\Delta mdtJI$  pourrait s'expliquer par l'excrétion par la pompe MdtJI de composé interférant avec processus d'internalisation ou le fonctionnement du macrophage.

Le screening réalisé avec l'outil Phenotype Microarray de Biolog dans le but d'identifier un ou des substrats de ce système d'efflux n'a pas permis de mettre en évidence de fortes différences de croissance entre les bactéries possédant le système d'efflux et celles ne le possédant pas. L'analyse de la croissance en présence des conditions du Biolog pour lesquelles les différences entre les deux souches étaient les plus marquées a été ensuite réalisée de façon individuelle en microplaque 96 puits.

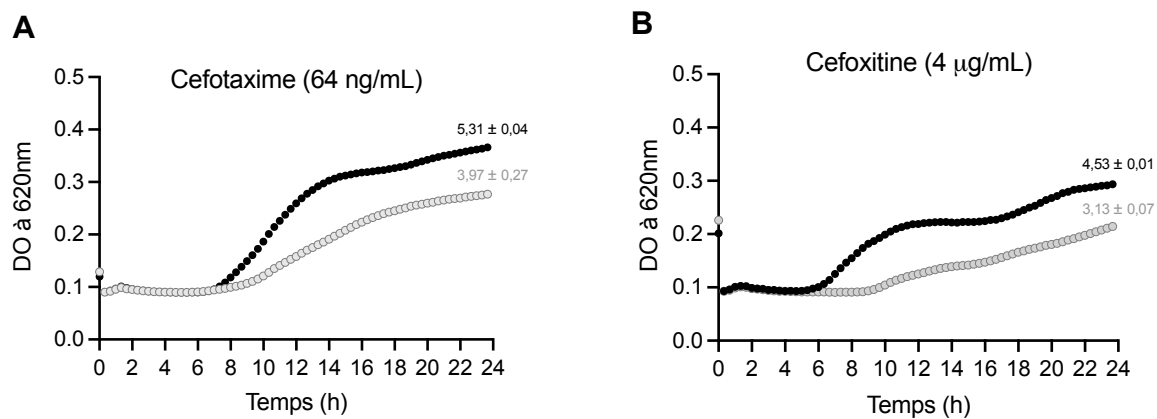


Figure 51 : **Courbes de croissance en présence d'antibiotique.** Les figures représentent les courbes de croissance de la souche sauvage de *K. pneumoniae* CH1476 (noir) et de son mutant isogénique  $\Delta mdtII$  (gris). La croissance bactérienne est suivie par mesure de la DO à 620 nm toutes les 20 min pendant 24h en présence de cefotaxime (64 ng/mL) (A) ou de cefoxitine (4 µg/mL) (B). Les valeurs indiquent l'aire sous la courbe ( $\pm$  SEM ). Les données de courbe de croissance correspondent à une moyenne de trois réplicats techniques.

**Tableau 2** : Souches bactériennes et plasmides utilisés au cours de cette étude.

Souches ou plasmides	Description	Résistances antibiotique	Numéro de collection	Source
<b>Souches</b>				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				
<i>Kp</i> -Sp <sup>R</sup>	Souche sauvage, <i>Kp</i> -Ap <sup>R</sup> $\Delta$ shv::aadA7	Sp	CH1476	Cette étude
$\Delta$ mdtII-Km <sup>S</sup>	<i>Kp</i> -Sp <sup>R</sup> $\Delta$ mdtII	Sp	CH1532	Cette étude
$\Delta$ mdtII/pSTAB	<i>Kp</i> -Sp <sup>R</sup> $\Delta$ mdtII complétée avec plasmide pSTAB vide	Sp, Ap	CH1761	Cette étude
$\Delta$ mdtII/pSTAB_mdt	<i>Kp</i> -Sp <sup>R</sup> $\Delta$ mdtII complétée avec plasmide pSTAB_mdt	Sp, Ap	CH1762	Cette étude
<i>Escherichia coli</i> K-12				
MG1655/pSTAB	Plasmide pSTAB vide	Sp, Ap	CH1763	Cette étude
MG1655/pSTAB_mdt	Plasmide avec insertion de l'opéron <i>mdtII</i>	Sp, Ap	CH1764	Cette étude
<b>Plasmides</b>				
pKD4	Plasmide avec une cassette de résistance à la kanamycine flanquée de part et d'autre par des sites FRT et utilisé pour amplifier la cassette de résistance à la kanamycine, Km <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	Km, Ap		(Datsenko & Wanner, 2000)
pKOBEG199	Plasmide qui encode les protéines de recombinaison Lambda Red, Tc <sup>R</sup>	Tc		(Chaveroche & Ghigo, 2000)
pCP20	Plasmide avec le gene codant la recombinaise flippase (FLP, aka <i>exo</i> ) originaire de levure, des genes de résistance au chloramphénicol et à l'ampicilline et une origine de répllication thermo inductible, Cm <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	Cm, Ap		(Cherepanov & Wackernagel, 1995)
pSTAB	Plasmide dérivé du plasmide pZE, contient le système toxine-antitoxine <i>flm</i> du plasmide F, Ap <sup>R</sup>	Ap		J.M. Ghigo

Ap: Ampiciline, Sp: Spectinomycine, Km: Kanamycine, Tc: Tetracycline, Cm: Chloramphenicol

Le mutant  $\Delta mdtJI$  montre une croissance ralentie mais de façon non significative comparativement à la souche sauvage pour les molécules antibiotiques suivantes : cefotaxime et ceftioxime (Figure 51).

## Conclusion

En conclusion, les expériences présentées ci-dessus n'ont pas clairement permis de définir le rôle du système d'efflux MdtJI chez la souche de *K. pneumoniae* CH1476. La première hypothèse était que cette pompe, plus exprimée lorsque les bactéries se détachent du biofilm (bactéries dispersées), pouvait jouer un rôle dans l'expression du phénotype associé aux bactéries dispersées, i.e. capacité d'adhésion accrue et résistance à l'activité bactéricide des macrophages. Au regard de la littérature, il semble évident que les pompes à efflux telles que le système MdtJI ne servent pas seulement à résister aux composés antimicrobiens mais sont largement impliquées dans les processus physiologiques bactériens (Minagawa et al., 2012; Schembri et al., 2003; Yamanaka et al., 2008). Les précédents travaux de Willsey et al. ont révélé l'importance de MdtJI chez *K. pneumoniae* lors de l'infection au niveau pulmonaire sans réussir à identifier précisément quel était le mécanisme de ce système d'efflux (Willsey et al., 2018). Les poumons étant le lieu d'une forte réponse immunitaire, l'importance de la pompe à efflux MdtJI dans la survie de *K. pneumoniae* dans ce site infectieux peut être reliée aux expérimentations de survie en macrophages qui montrent un avantage conféré par la présence de la pompe à efflux MdtJI. De plus, il a également été montré que l'excrétion de certaines polyamines, une famille de composés transportés par la pompe MdtJI, par les bactéries peut perturber le fonctionnement des cellules de l'immunité (Lasbury et al., 2007; Mariggio et al., 2004). La fonction de la pompe à efflux MdtJI, fortement exprimée dans les bactéries dispersées de biofilm, reste méconnue. Le rôle de ce système d'efflux dans le processus de la dispersion devra être analysé.

## Matériel et méthodes

### Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés lors de cette étude sont répertoriés dans le Tableau 2. Les souches bactériennes sont cultivées en milieu LB (Lysogeny Broth) ou M63B1 additionné de 0,4% de glucose, en condition aérobie à 37°C. Elles sont conservées à -80°C dans du LB contenant 15% de glycérol (v/v). Les cultures sontensemencées à partir de pré-cultures de 18h en LB ou M63B1 à 37°C. Si besoin, les antibiotiques kanamycine et tétracycline sont ajoutés au milieu de culture à une concentration finale respective de 50 µg/mL et 35 µg/mL. Pour l'obtention des bactéries planctoniques exponentielles et stationnaires, des cultures de 3h et 18h respectivement à 37°C sous agitation sont réalisées. Pour l'obtention de bactéries dispersées et sessiles (biofilm), les bactéries sont cultivées dans un système en flux continu appelé « flow-cell ». Ce système est constitué d'une chambre en verre



**Tableau 3** : Amorces utilisées durant cette étude.

Numéro	Nom des amorces	Séquence oligonucléotidique (5'→3')	Taille du produit PCR (bp)	Utilisation
P1	1476_ <i>mdtI</i> -KmFRT-Fw	TTCCTGTTTACGTCTCGCGTAAACGGTAATGGATTATATTCTCAA GCAGGAGAAGGGATCGTCTTGAGCGATTGTGTAGG	1615 pb	Amplification de la cassette de résistance à la kanamycine bordée par les régions adjacentes à l'opéron <i>mdtII</i> (construction du mutant $\Delta$ <i>mdtII</i> )
P2	1476_ <i>mdtI</i> -KmFRT-Rv	AGCGGGCAAGGCGTGAAGGAAGTTTCCGTTTGCCGCTGGCTTGCAGGCGGC GAGACGTGGTCCATATGAATATCCTCC		
P3	1476_ <i>mdtI</i> -Fw	GCGCTATAGTCACCTTCTT	1790 / 397 pb	Vérification de l'insertion chromosomique de la cassette de résistance à la kanamycine dans mutant isogénique $\Delta$ <i>mdtI</i> , et vérification de la délétion par PCR et séquençage
P4	1476_ <i>mdtI</i> -Rv	GAGGCCGGTGAAGAATATCA		
P5	KmFRT-Fw	GTCTTGAGCGATTGTGTAGG	1495 pb	Vérification de l'insertion chromosomique de la cassette de résistance à la kanamycine dans mutant isogénique $\Delta$ <i>mdtI</i>
P6	KmFRT-Rv	TGGTCCATATGAATATCCTCC		
P7	pSTAB_ <i>mdtII</i> -Fw	GACCGAATTCTCGGCGCTATAGTCACCTTC	976 pb	Amplification de l'opéron <i>mdtII</i> et de son promoteur pour clonage dans plasmide pSTAB
P8	pSTAB_ <i>mdtII</i> -Rv	TCATGGTACCGAGCCGGTGAAGAATATCA		
P9	pSTAB- <i>flm</i> -Fw	GATACTGAGCACATCAGCAGG	1094 pb	Vérification de l'insertion du fragment entre les sites de restriction <i>EcoRI</i> et <i>KpnI</i> sur le plasmide pSTAB par PCR et séquençage
P10	pSTAB- <i>flm</i> -Rv	CTGCACTGAAGCGCCTTTAT		
P13	1476_ <i>mdtI</i> -RT-qPCR-Fw	TAATGCTGGCCATGATTGCC	92 pb	Analyse de l'expression de <i>mdtI</i> par qPCR
P14	1476_ <i>mdtI</i> -RT-qPCR-Rv	AATACCGATCCCTCCACACA		
P15	1476_ <i>mdtI</i> -RT-qPCR-Fw	ATCGATCTCTCGGTCGCCTA	116 pb	Analyse de l'expression de <i>mdtI</i> par qPCR
P20	1476_ <i>mdtI</i> -RT-qPCR-Rv	CCCGCCAGCCTTTGTTATT		

(dimension : 54 x 19 x 6 mm ; 6156 mm<sup>3</sup>) permettant le développement du biofilm, d'une pompe péristaltique permettant la circulation du milieu et d'une enceinte thermostatée maintenant l'ensemble du dispositif à 37°C. Le système est préalablement stérilisé par circulations successives d'hypochlorite de sodium à 10% pendant 1h, d'éthanol pendant 1h puis de milieu M63B1 stérile pendant 1h. Les flow-cells sontensemencées par introduction de 5.10<sup>8</sup> UFC dans la chambre. Après 1h d'incubation, la pompe péristaltique est mise en route à un débit de 0,54mL/min. Les bactéries spontanément décrochées du biofilm (« dispersées ») sont récupérées dans l'effluent de la flow-cell après 13h d'incubation, et le biofilm formé à l'intérieur de la flow-cell est décroché mécaniquement par agitation et vortex après 16h d'incubation.

#### Extraction d'ARN et RT-qPCR

Les ARN totaux ont été extraits à partir de triplicats biologiques de suspensions bactériennes correspondant à 3 conditions : « planctonique exponentielle » (PE), « biofilm » (B) et « dispersée » (CD). Pour la condition (PE), 10<sup>9</sup> UFC sont centrifugées à 4000g pendant 10 min à 4°C, et le culot est repris dans 1mL de RNeasy Lysis Buffer (Qiagen). Pour les conditions (B) et (CD), les suspensions bactériennes issues des flow-cells sont centrifugées à 4000g pendant 10 min à 4°C et les culots sont repris dans 1mL de RNeasy Lysis Buffer (Qiagen). L'extraction est ensuite réalisée selon la méthode décrite par Toledo-Arana *et al.* (Toledo-Arana *et al.*, 2009). Brièvement, les bactéries sont lysées mécaniquement dans le système PreCellys (Bertin Technologies) en 2 cycles de 30s à 6000 rpm. Après extraction au phénol acide (Thermo Fisher Scientific) et au TRIzol (Invitrogen), les ARNs totaux sont précipités avec de l'isopropanol (Thermo Fisher Scientific). Les extraits d'ARN sont ensuite traités avec 10 unités de TURBO DNase (Ambion), précipités et mis en suspension dans de l'eau traitée au DEPC avant leur quantification avec le système Qubit (Thermo Fisher Scientific). L'absence de contamination par de l'ADN génomique a été vérifiée par qPCR avec les amorces RT-*cpxR*-Fw/RT-*cpxR*-Rv (Tableau 3) et le kit SsoAdvanced SYBR Green Supermix (BioRad) selon les recommandations du fabricant. La transcription inverse est réalisée à partir de 500 ng d'ARN totaux à l'aide du kit iScript (BioRad) selon les recommandations du fabricant, et les qPCR sont réalisées à l'aide du kit SsoAdvanced SYBR Green Supermix (BioRad) sur un C1000 Thermal Cycler-CFX96 (BioRad) avec 2 paires d'amorces correspondant aux deux gènes de l'opéron *mdtJI* : RT-*mdtJ*-Fw/RT-*mdtJ*-Rv et RT-*mdtI*-Fw/RT-*mdtI*-Rv (Tableau 3). L'efficacité d'amplification de chaque paire d'amorces est évaluée à partir d'une courbe standard obtenue par quatre séries de dilutions d'ADN génomique. Le gène *cpxR* est utilisé comme gène de ménage pour normaliser les niveaux d'expression et la condition « Biofilm » est utilisée comme échantillon « calibrateur ».

### Création du mutant isogénique

Le mutant  $\Delta mdtII$  a été construit par double échange allélique en remplaçant les 2 gènes de l'opéron *mdtII* par une cassette de résistance à la kanamycine (Datsenko and Wanner, 2000). Un fragment d'ADN linéaire correspondant à la cassette de résistance bordée par 60pb homologues aux régions adjacentes de l'opéron *mdtII* a été amplifié en utilisant le plasmide pKD4 comme matrice et les amorces P1 et P2 (Tableau 3). Le fragment obtenu a été introduit par électroporation dans la souche *K. pneumoniae* CH1476 possédant le plasmide pKOBEG199 permettant la production des protéines Red. Les clones obtenus sont par la suite sélectionnés sur géloses LB supplémentées avec de la kanamycine, et la perte du plasmide pKNG101 est vérifiée par le phénotype de sensibilité à la tétracycline. La cassette de résistance est ensuite éliminée via l'action d'une flipase dont le gène est porté par le plasmide pCP20 préalablement introduit par transformation dans le mutant isogénique. La construction de la souche transcomplémentée a été réalisée par amplification de la région correspondant à l'opéron *mdtII* et à son promoteur à partir de l'ADN génomique de *K. pneumoniae* CH1476. Le fragment amplifié a été cloné en utilisant la technique de Gibson assembly (New England BioLabs) dans le plasmide pSTAB. Les PCRs ont été réalisées en utilisant les ADN polymérases suivantes : Phusion high-Fidelity ADN polymerase (New England BioLabs) et Takara LA Taq (Takara Biotechnology Inc).

### Formation de biofilm

La capacité de formation de biofilm des souches de *K. pneumoniae* CH1476 sauvage, du mutant  $\Delta mdtII$  et du mutant transcomplémenté  $\Delta mdtII/pSTAB\_mdt$  a été évaluée dans trois différents modèles de culture : en modèle statique sur des surfaces en polystyrène (microplaque Corning, 96 puits à fond rond) et sur des lamelles de verre (Falcon, 24 puits à fond plat), ainsi que dans un modèle cinétique (microfermenteur) sur spatule en verre. Pour l'analyse du biofilm en microplaque 96 puits, l'ensemencement est réalisé avec  $10^6$  bactéries par puit dans 100 $\mu$ L de M63B1. Après 5h d'incubation à 37°C, les puits sont rincés 2 fois avec du PBS et les biofilms formés sont quantifiés par coloration au cristal violet via l'ajout de 100 $\mu$ L/puit d'une solution à 0,5% (v/v) suivi d'une incubation de 10 min. Les puits sont ensuite rincés 3 fois avec du PBS, et la biomasse est quantifiée par mesure de la densité optique à 570 nm après solubilisation dans de l'éthanol 100%. Pour l'analyse du biofilm formé sur lame de verre, les puits sontensemencés avec  $10^7$  bactéries en M63B1 puis la microplaque est incubée 3h à 37°C. Les lamelles de verre sont ensuite récupérées, lavées deux fois dans du PBS, puis soumises à 2 sonications de 5 min dans 2mL de PBS. Des dilutions sérielles des suspensions bactériennes sont ensuite étalées sur géloses LB agar et mises à incuber à 37°C. La biomasse de biofilm est quantifiée par détermination du nombre d'UFC. Pour l'analyse du biofilm en modèle de microfermenteur, les spatules

sontensemencées par trempage dans une suspension bactérienne à  $10^8$  bactéries/mL pendant 5 min. Les microfermenteurs sont perfusés avec du milieu M63B1 à un débit de 1,2mL/min. Après 24h à 37°C, la biomasse sur les spatules est décrochée mécaniquement par vortex dans 15mL d'eau physiologique. Des dilutions sérielles des suspensions sont étalées sur gélose LB, et la biomasse est quantifiée par détermination du nombre d'UFC.

#### Mesure de la solidité du biofilm

La solidité du biofilm a été évaluée à partir de biofilms formés en microplaques (Falcon, 24 puits à fond plat) comprenant une lamelle de verre par puit. Deux microplaques sontensemencées en parallèle avec  $10^6$  bactéries par puit dans 1mL de M63B1 puis incubées 5h à 37°C. Chaque puits est ensuite lavé une fois avec du PBS. Pour une microplaque, les lamelles de verre sont récupérées pour déterminer la biomasse de biofilm formée comme décrit précédemment. La seconde microplaque subit une étape de sonication de 1min30, puis les surnageants ainsi que les lamelles de verre sont récupérées pour déterminer à la fois la quantité de bactérie détachées et la biomasse de biofilm à la surface des lamelles. Après sonication et vortex des lamelles dans 1mL d'eau physiologique, des dilutions sérielles de la suspension sont ensuite étalées sur gélose LB mises à incuber à 37°C et le nombre d'UFC est déterminé.

#### Adhésion sur cellules *in vitro*

Les cellules Calu-3 dérivées d'un adénocarcinome pulmonaire humain sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Dominique Dutscher) supplémenté avec 10% (v/v) de sérum bovin préalablement inactivé à 56°C pendant 30 min (Dominique Dutscher). Les cellules sont maintenues dans une atmosphère humide à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Pour l'analyse de l'adhésion bactérienne, une microplaque 24 puits (Falcon, 24 puits à fond plat) estensemencée avec  $5 \times 10^5$  cellules par puits. Les cellules sont ensuite incubées pendant 24h pour atteindre un niveau de confluence d'au moins 80%. La monocouche cellulaire est ensuite infectée à une multiplicité d'infection de 10 bactéries par cellules dans un volume de 1mL par puit. Après 3h d'infection à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>, le tapis cellulaire est lavé 3 fois avec du PBS pour retirer les bactéries non attachées, et 1mL de Triton 1% (dilué dans du PBS) par puit est ajouté pour détacher les cellules. Les suspensions obtenues sont ensuite homogénéisées par pipetage et des dilutions sérielles sont étalées sur gélose LB mises à incuber à 37°C. La quantité de bactéries adhérentes aux cellules Calu-3 est quantifiée par détermination du nombre d'UFC.

### Survie en macrophage

Les macrophages murins J774A.1 sont cultivés en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Dominique Dutscher) supplémenté avec 10% (v/v) de sérum bovin préalablement inactivé à 56°C pendant 30 min (Dominique Dutscher). Les cellules sont maintenues dans une atmosphère humide à 37°C et avec 5% de CO<sub>2</sub>. Pour évaluer l'activité de phagocytose et la survie/multiplication intracellulaire des bactéries, une microplaque 24 puits (Falcon, 24 puits à fond plat) estensemencée avec  $5 \times 10^5$  cellules par puits. Les cellules sont ensuite incubées 24h pour atteindre un niveau de confluence d'au moins 80%. Les cellules sont infectées à une multiplicité d'infection de 10 bactéries par cellules dans un volume de 1mL par puit, puis la microplaque est centrifugée 10 min à 1000g. Après 20 min d'incubation à 37°C, le tapis cellulaire est lavé deux fois avec du PBS, et 1mL de culture cellulaire supplémenté de gentamicine (50 µg/mL) est ajouté par puit. Les cellules sont incubées de nouveau à 37°C pendant 30 min pour évaluer le taux de phagocytose, ou pendant 24h pour évaluer la survie/multiplication bactérienne. Après incubation, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS et 1mL de Triton 1% (dilué dans du PBS) est ajouté par puit. Les suspensions obtenues sont ensuite homogénéisées par pipetage et des dilutions sérielles sont étalées sur gélose LB agar et incubées à 37°C. Les bactéries sont quantifiées par détermination du nombre d'UFC. Le taux de phagocytose est exprimé en pourcentage des bactéries vivantes après 50min (30min+20min) par rapport à l'inoculum défini comme 100 %. La survie/multiplication bactérienne est exprimée comme le pourcentage moyen de bactéries récupérées 24 h post infection par rapport au nombre de bactéries phagocytées, défini comme 100 %.

### Survie en présence de peroxyde d'hydrogène

La capacité de résistance des bactéries à la présence de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dans le milieu est déterminée à partir de cultures planctoniques en M63B1 + 0,04% de glucose. Le milieu de culture estensemencé avec 10<sup>6</sup> bactéries par mL et l'incubation a lieu pendant 4h à 37°C. Du peroxyde d'hydrogène est ensuite ajouté aux concentrations finales de 2mM ou 5mM, et les cultures sont incubées à nouveau 1h30 à 37°C. Des dilutions sérielles des cultures sont ensuite étalées sur gélose LB mises à incuber à 37°C de façon à calculer le nombre d'UFC. La capacité des bactéries à survivre à l'exposition au peroxyde d'hydrogène est le rapport du nombre total de bactéries vivantes après traitement par rapport au nombre de bactéries contenues dans le tube contrôle sans traitement. Des triplicats techniques et biologiques sont réalisés.

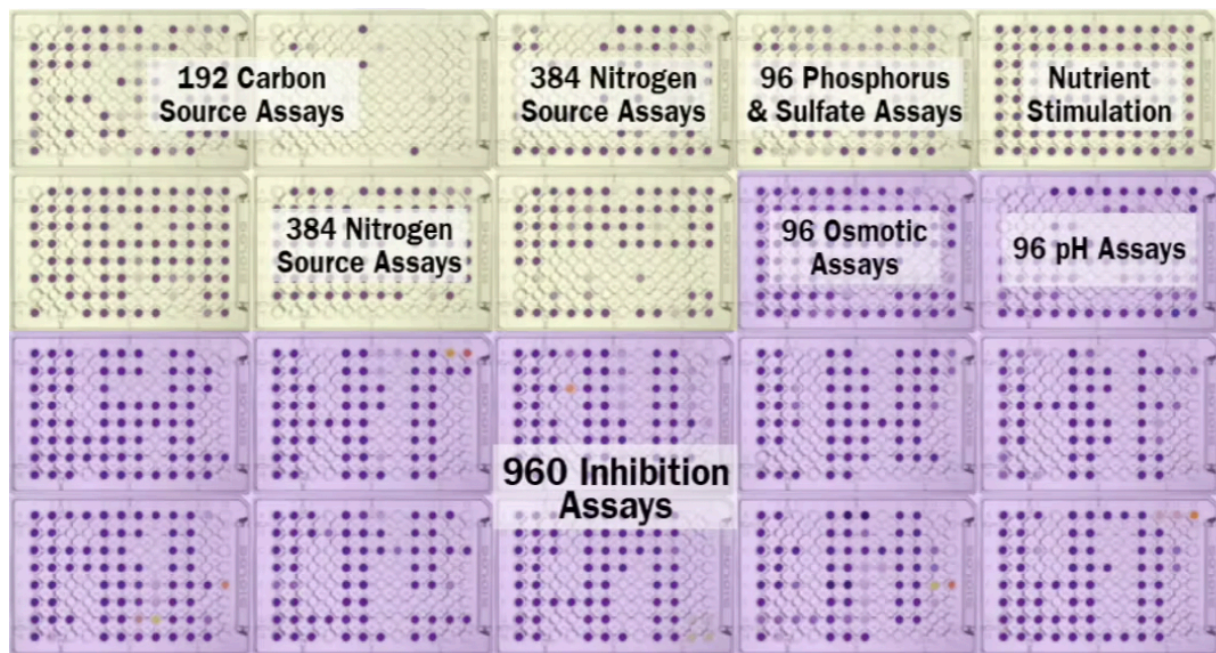


Figure 52 : **Représentation des 20 systèmes en plaque « Phenotype Microarrays » de Biolog.** Ces microplaques permettent de tester les phénotypes de croissance bactérienne en présence de différents substrats ou drogues par la mesure du niveau de respiration cellulaire ([www.biolog.com](http://www.biolog.com)).

**Tableau 4** : Conditions affectant la croissance du mutant  $\Delta mdxII$  – Données d’AUC (Aire Under the Curve) obtenues à partir du Phenotype Microarray (Biolog)

	Substrat	AUC		Ratio AUC	Plaque Biolog
		<i>K. pneumoniae</i> CH1476	<i>K. pneumoniae</i> $\Delta mdxII$		
<b>pH</b>					
	4,5	5089,88	3451,00	1,47	
	5	5470,38	4154,00	1,32	
	6	6019,63	3978,00	1,51	
	7	6867,13	4517,88	1,52	PM10
	8	6596,13	3281,50	2,01	
	9,5	6692,63	3978,25	1,68	
	10	6716,38	4983,63	1,35	
<b>NaCl</b>					
	1%	7877,17	6592,83	1,19	
	3%	6767,44	5918,55	1,14	
	4%	6033,68	5563,75	1,08	
	5%	5282,33	4980,38	1,06	
	6%	3519,50	3198,04	1,10	PM9
	6,5%	4679,37	3655,31	1,28	
	8%	1224,46	3083,76	0,40	
	10%	3310,83	3823,96	0,87	
<b>Tetracycline</b>					
	1 µg/mL	6208,75	5334,38	1,16	
	0,5 µg/mL	6001,25	4526,38	1,33	
	0,25 µg/mL	6789,63	4769,38	1,42	PM12
	0,125 µg/mL	6018,50	3144,00	1,91	
<b>Fosfomycine</b>					
	134 µg/mL	6250,00	4770,38	1,31	
	67 µg/mL	6060,63	4124,25	1,47	
	16,75 µg/mL	6881,13	4390,75	1,57	PM16
	8,37 µg/mL	6476,50	3402,13	1,90	
<b>Ciprofloxacin</b>					
	8 ng/mL	7255,88	6918,88	1,05	
	4 ng/mL	6765,00	6317,38	1,07	
	2 ng/mL	6745,88	6116,63	1,10	PM20
	1 ng/mL	1617,88	4052,88	0,40	
<b>Cefoxitine</b>					
	8 ng/mL	6418,75	7688,88	0,83	
	4 ng/mL	6840,00	6948,50	0,98	
	2 ng/mL	7024,50	6708,38	1,05	PM14
	1 ng/mL	2126,38	5733,13	0,37	
<b>Cefotaxime</b>					
	128 ng/mL	7357,50	2417,88	3,04	
	64 ng/mL	2016,50	2374,38	0,85	
	32 ng/mL	2237,63	2129,25	1,05	PM16
	16 ng/mL	2142,88	2265,88	0,95	

### Caractérisation phénotypique par microarrays (Biolog)

Le test de phénotypage appelé Phenotype Microarrays (PM)(Biolog) est réalisé dans des microplaques 96 puits (Biolog) contenant différentes substances (nutriments, drogues, ...), et la croissance bactérienne est évaluée au cours du temps via la mesure du niveau de respiration cellulaire par un dosage colorimétrique. Douze types de plaque (PM9 à PM20) sont utilisés ; ils permettent d'analyser les phénotypes liés à la pression osmotique et aux ions, à l'effet du pH ou encore à la sensibilité face à 240 composés chimiques divers (dont des antibiotiques) (Bochner, 2001) (Figure 52). Les plaques sontensemencées et incubées selon les recommandations du fabricant. Brièvement, les inocula sont réalisés à partir de colonies bactériennes et la densité cellulaire est ajustée à 42% de transmittance via la mesure grâce à un turbidimètre Biolog. Après des dilutions successives, les microplaques PM9 à PM20 sont inoculées et mises à incuber à 37°C pendant 24h dans un OmniLog (Biolog). Les données colorimétriques obtenues, directement corrélées à la cinétique de croissance, sont analysées avec le logiciel OmniLog-PM (Biolog). Les valeurs d'aire sous la courbe (Area under the curve, AUC) obtenues pour chaque souche dans chacun des puits ainsi qu'une valeur du ratio des AUC des deux souches a permis de sélectionner les conditions pour lesquelles une différence de croissance était observée entre les deux souches (Tableau 4).

Les conditions permettant d'observer une inhibition de croissance dans le test Biolog sont ensuite testées dans des essais complémentaires en microplaque 96 puits (Falcon, 96 puits fond plat). Les conditions suivantes sont testées : pH (4,5 à 10), NaCl (1% à 10%), cefotaxime (128 ng/mL ; 64 ng/mL ; 32 ng/mL et 16 ng/mL), cefoxitine (8 µg/mL ; 4 µg/mL ; 2 µg/mL et 1 µg/mL), ciprofloxacine (8 ng/mL ; 4ng/mL ; 2 ng/mL et 1 ng/mL), tetracycline (1 µg/mL ; 0,5 µg/mL ; 0,25 µg/mL et 0,125 µg/mL) et fosfomycine (134 µg/mL ; 67 µg/mL ; 16,75 µg/mL et 8,37 µg/mL). Chaque puit estensemencé avec 10<sup>6</sup> bactéries/puit dans 1mL de LB dilué au 1/10, et les plaques sont incubées à 37°C pendant 12h dans un lecteur de microplaque (Spark, TECAN). La croissance est suivie par mesure de la densité optique à 620 nm avec prise de mesure toutes les 20 min. Des triplicats techniques et biologiques sont réalisés. Les résultats obtenus sont ensuite représentés sous forme d'une courbe de croissance dont les aires sous la courbe sont calculées via le logiciel GraphPad Prism 9 pour comparer le niveau de croissance de la souche sauvage *K. pneumoniae* CH1476 et son mutant isogénique  $\Delta$ mdtJl.



---

## Discussion générale et perspectives

---

L'étude des déterminants de la pathogénicité et de la virulence de *K. pneumoniae* est un aspect essentiel de la caractérisation de ce pathogène et de la compréhension de son processus infectieux. Lors de la phase de colonisation, *K. pneumoniae* met en place un certain nombre de facteurs d'adhésion et notamment des fimbriae de la famille chaperone-usher (CU). Les fimbriae de type 1 et de type 3 ont été largement décrits, mais de plus récentes études ont mis en évidence huit autres clusters potentiels de cette famille dans le génome de la souche *K. pneumoniae* LM21 (Khater *et al.*, 2015; Paczosa and Meccas, 2016). Parmi ces systèmes, il a été montré que le fimbriae Kpg joue un rôle dans l'adhésion aux cellules *in vitro* et dans la colonisation intestinale en modèle murin. Nous avons ainsi recherché la présence de ce fimbriae dans une base de données de 424 génomes de *Klebsiella* grâce à un modèle bio-informatique basé sur les séquences protéiques du système Kpg de référence de la souche *K. pneumoniae* CH1157. Ce système fimbrial a ainsi été retrouvé avec une forte prévalence dans la majorité des espèces du genre *Klebsiella*, exceptée *K. aerogenes*. Néanmoins, la même analyse réalisée sur une base de données de génomes de procaryotes a révélé que des systèmes similaires à Kpg sont présents dans d'autres espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* (appartenant aux genres *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Proteus*) mais étonnement peu prévalents chez *E.coli*. Il est également retrouvé chez des genres plus éloignés de *Klebsiella* que sont *Burkholderia* et *Pseudomonas*. Ces différents éléments mettent en évidence un possible échange des gènes codant ce fimbriae via des transferts horizontaux de gènes ou des éléments génétiques mobiles entre bactéries. Ce scénario d'acquisition a été renforcé par d'autres analyses bioinformatiques. La reconstruction des états ancestraux de la phylogénie du cluster de gènes *kpg* a montré que ce locus a évolué très rapidement au sein de la phylogénie, ce qui n'est pas le cas lorsqu'un élément génétique évolue en suivant l'évolution classique des espèces. De plus, l'absence de corrélation entre la phylogénie construite à partir de 695 protéines appartenant au core génome et celle de la protéine la plus conservée du système, la protéine usher KpgC, confirme bien que ce type d'évolution. Les mécanismes évolutifs par transferts horizontaux permettent aux microorganismes d'avoir une grande plasticité génomique et ainsi de pouvoir s'adapter rapidement à un nouvel environnement ou stress extérieur (Juhas, 2015). Ils sont d'autant plus importants quand ils concernent des structures de surface. Il a ainsi été montré chez *Salmonella* que l'évolution des clusters de gènes fimbriaux par transferts horizontaux conduit à une combinaison unique de systèmes fimbriaux pour chaque sérotype (Bäumler *et al.*, 1997).

La présence du système Kpg ayant été confirmée au niveau génomique par des analyses bio-informatiques, l'objectif suivant a été de vérifier la production de ce fimbriae et sa présence dans la membrane bactérienne. La protéine correspondant à l'adhésine putative du système, KpgA, a été recherchée par Western-blot après construction sur le chromosome bactérien d'un gène recombinant *kpgA* portant un tag HA (*kpgA::HA*) au sein de l'opéron *kpgABCD*. La présence de la protéine chimérique KpgA-HA n'a pas pu être dans des extraits protéiques de souche *K. pneumoniae* CH1476

portant cette construction en raison d'un trop faible niveau d'expression de ce système dans nos conditions de laboratoire. Une absence d'expression basale des fimbriae a pu être observée pour d'autres systèmes CU (Humphries et al., 2003; Low et al., 2006). La construction d'une protéine chimérique KpgA-HA clonée dans le plasmide pBAD24 et sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose a ainsi permis sa détection dans des extraits de protéines membranaires, que ce soit dans une souche de *K. pneumoniae* ou d'*E. coli*. Des analyses par microscopie électronique à transmission couplées à un immunomarquage par des billes d'or n'ont cependant pas permis d'observer la protéine chimérique KpgA-HA, même en situation de surexpression. La localisation membranaire de l'adhésine et des sous-unités majeures des systèmes CU - par exemple le fimbriae ECP d'*E. coli* - a été mise en évidence via ce type d'approche dans la littérature (Blackburn et al., 2009; Garnett et al., 2012). Des observations en microscopie confocale après un immunomarquage fluorescent de la putative adhésine ou de la sous-unité majeure de Kpg pourrait permettre de visualiser l'expression de ce fimbriae, et de déterminer si leur présence est permanente ou associée aux différentes phases de colonisation (de l'adhésion initiale à un biofilm jeune). De précédents résultats obtenus au laboratoire avec un mutant  $\Delta kpgC$  ont montré que Kpg joue un rôle dans la colonisation du tractus intestinal en modèle murin (Khater et al., 2015). L'expression des gènes de l'opéron *kpgABCD* dans deux conditions physiologiques spécifiques de la colonisation intestinale (en présence de bile à 0,2% et à pH 4,5) n'était cependant pas augmentée comparativement à une condition standard de laboratoire. Il serait intéressant de tester d'autres conditions correspondant aux paramètres physico-chimiques de l'environnement intestinal pour mieux appréhender l'expression de ce fimbriae, ce qui pourrait nous guider sur le tropisme de ce dernier.

Le fimbriae Kpg appartient au sous-clade  $\gamma 1$ , dont font partie plusieurs fimbriae CU impliqués dans les processus d'adhésion et de colonisation de *K. pneumoniae* (Khater et al., 2015; Stahlhut et al., 2012; Struve et al., 2009; Wu et al., 2010). Cependant, le mutant  $\Delta kpgABCD$  de *K. pneumoniae* CH1476 n'a montré aucune différence d'adhésion sur cellules intestinale Int-407 comparativement à la souche sauvage. Ces résultats sont inattendus puisqu'un mutant déficient pour le gène de l'usher du système, *kpgC*, précédemment construit dans la souche *K. pneumoniae* LM21 a montré une atténuation de ses capacités d'adhésion sur la même lignée cellulaire (Khater et al., 2015). Les différences phénotypiques observées entre les deux mutants ( $\Delta kpgABCD$  et  $\Delta kpgC$ ) pourraient résulter de différences dans les mécanismes de régulation du système entre les deux souches de *K. pneumoniae* ou encore de l'expression différentielle d'autres facteurs d'adhésion qui pourraient masquer le phénotype du fimbriae Kpg dans la souche CH1476.

Une autre approche pour mieux connaître les processus de colonisation intestinale en lien avec ce fimbriae consisterait à identifier son (ses) récepteur(s) spécifique(s). Le niveau de liaison entre les adhésines ou sous-unités protéiques purifiées du fimbriae Kpg et leur récepteur pourrait être quantifié

*in vitro* grâce à différentes lignées cellulaires ou en utilisant des systèmes expérimentaux de type « glycan arrays ». L'interaction adhésine-récepteur a ainsi été évaluée par Garnett *et al.* pour le fimbriae ECP d'*E. coli* en quantifiant les niveaux de liaison des protéines EcpA (adhésine), EcpD (sous-unité majeure) ou ECP (fimbriae purifié) avec les cellules HeLa. Les protéines EcpA et EcpD portant un tag histidine ou le complexe ECP ont été incubés individuellement en présence de cellules HeLa. La fixation des protéines sur les cellules a ensuite été mesurée par immunofluorescence en utilisant des anticorps anti-Histidine ou anti-ECP. Par cette approche, les auteurs ont ainsi mis en évidence que la protéine EcpA possède des propriétés adhésives, mais également la sous-unité majeure EcpD (Garnett *et al.*, 2012). Quant à la technique impliquant des « glycan arrays », elle consiste à tester les forces d'adhésion de protéines purifiées grâce à des micro-puces comprenant différents résidus glycanes. Lonardi *et al.* ont ainsi pu identifier les récepteurs spécifiques de certains fimbriae présents chez *E. coli* et caractériser le domaine lectine de leur adhésine, notamment les adhésines F17G et FedF d'*E. coli* enterotoxigéniques et FimH d'*E. coli* uropathogènes (Lonardi *et al.*, 2013). Ce système a également été utilisé pour comparer les forces d'interaction adhésine-récepteur d'un même fimbriae appartenant à différentes souches d'*E. coli* pathogène (Lonardi *et al.*, 2013). Au-delà du tropisme cellulaire, il est un important de garder à l'esprit que *K. pneumoniae* est une bactérie ubiquiste retrouvée également dans l'environnement et, pour cette raison, la spécificité du fimbriae Kpg pour des récepteurs autres que ceux d'un hôte mammifère doit être envisagé.

Les fimbriae CU ont été largement décrits pour leur rôle dans la formation de biofilm ; c'est le cas notamment les fimbriae de type 3 (*mrk*) (Murphy and Clegg, 2012; Schroll *et al.*, 2010; Wilksch *et al.*, 2011), les fimbriae de type 1 (*fim*) et, plus récemment les fimbriae Kpc et Kpi (Gato *et al.*, 2020; Schroll *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010). La capacité du mutant  $\Delta kpgABCD$  de *K. pneumoniae* CH1476 à former du biofilm a donc été mesurée dans un modèle expérimental *in vitro*. En condition de culture standard de laboratoire (milieu LB), aucune différence de biomasse n'a été identifiée entre le mutant et la souche sauvage. Par ailleurs, l'addition de sels biliaires à 0,2% dans le milieu entraîne une augmentation du biofilm de la souche sauvage de *K. pneumoniae* CH1476, contrairement à celui de la souche mutante qui ne présente pas d'augmentation. Cependant, aucune différence dans les nombres d'UFC respectifs n'a été observé entre les biofilms formés par les deux souches en présence de bile ; cette augmentation de biomasse de biofilm pourrait ainsi résulter d'une augmentation de la production de matrice. L'expression des gènes de l'opéron *kpgABCD* n'étant pas surexprimés en présence de sels biliaires, la présence de fimbriae semble donc jouer un rôle positif dans la formation de biofilm mais indépendamment d'une régulation de l'expression de *kpg*. Le rôle de la bile dans des processus physiologiques bactériens a largement été étudié. Au niveau du tractus digestif de l'hôte, les bactéries font face à certains composés toxiques de la bile comprenant des sels biliaires (sodium d'acide taurocholique, glycocholique, désoxycholique, chénodésoxycholique et cholique) mais également du

cholestérol, de la lécithine, des pigments (bilirubine et biliverdine), des phospholipides, des acides gras et des ions. Elles ont donc dû développer diverses stratégies de résistance face à ce type de stress. Néanmoins, de nombreux pathogènes bactériens se sont adaptés pour « tirer profit » de ces composés en les utilisant pour moduler leur pathogénicité (Hay and Zhu, 2016). De façon similaire à nos résultats, Chen *et al.* ont montré que l'ajout de sels biliaires dans un modèle *in vitro* augmente significativement la formation de biofilm par *K. pneumoniae*, mais ce phénotype n'est pas retrouvé avec un mutant  $\Delta pgaC$ , déficient dans la production du polysaccharide de matrice poly-B-1,6-N-acétylglucosamine (PNAG) (Chen *et al.*, 2014). De plus, le mutant  $\Delta pgaC$  est atténué dans ses capacités de colonisation dans un modèle murin de colonisation intestinale (Chen *et al.*, 2014). La stimulation de la formation de biofilm par les sels biliaires met en lumière l'importance du biofilm dans les processus de colonisation au niveau intestinal par *K. pneumoniae*, qui ne sont pas uniquement dépendants des capacités d'adhésion du pathogène. *Vibrio cholerae* est un autre pathogène décrit pour former davantage de biofilm en présence de bile et plus spécifiquement d'acides biliaires (cholate de sodium et desoxycholate de sodium). Cette augmentation de la formation de biofilm dépend des gènes *vps*, responsables de la synthèse de polysaccharides (Hung *et al.*, 2006). Hung *et al.* ont ainsi émis l'hypothèse que les acides biliaires induisent une activation post-traductionnelle du régulateur VpsR, ce qui active ensuite les gènes *vps* et conduit à la formation accrue de biofilm (Hung *et al.*, 2006). Il est également important de noter que la bile et certains de ses composants comme les sels biliaires ont un effet régulateur positif sur la virulence de certains pathogènes. L'acide désoxycholique, un sel biliaire secondaire, est capable d'induire l'expression de plusieurs gènes de virulence (*ciaB*, *cmeABC*, *dccR*, and *tlyA*) impliqués dans l'invasion mais également dans la production de fimbriae chez *Campylobacter jejuni* (Doig *et al.*, 1996; Malik-Kale *et al.*, 2008). La bile et les sels biliaires étant constitués de plusieurs composés, la formation de biofilm par la souche *K. pneumoniae* CH1476 et son mutant isogénique  $\Delta kpgABCD$  pourrait être testée en présence de ces différentes molécules de façon à déterminer l'influence respective de chacun de ces composés sur les fimbriae Kpg et la formation de biofilm. Nous avons montré que le rôle du fimbriae Kpg dans l'augmentation de la formation de biofilm ne résulte pas d'un mécanisme de régulation transcriptionnelle, les sels biliaires n'ayant aucun effet sur l'expression des gènes de l'opéron *kpgABCD*. Mais les sels biliaires étant capables de dénaturer les protéines en agissant comme des détergents, ils pourraient conduire à des modifications post-traductionnelles des protéines du complexe fimbrial KpgABCD, modifiant la conformation de ces structures de surface et leur activité (Hay and Zhu, 2016). Pour confirmer cette hypothèse, nous pourrions faire exprimer de manière constitutive l'opéron *kpgABCD* chez *K. pneumoniae* et mesurer le phénotype de formation de biofilm en présence et en absence de bile, un effet positif de la bile sur la formation de biofilm dans cette souche confirmera que le phénotype ne résulte pas d'une régulation transcriptionnelle. Enfin, puisque la concentration et la composition en sels biliaires varient le long du

tractus digestif de l'hôte, il serait pertinent d'évaluer les capacités de colonisation *in vivo* du mutant  $\Delta kpgABCD$  dans les différents compartiments intestinaux (duodenum, jejunum, ileum, colon) d'un modèle murin.

Un autre aspect de la pathogénicité de *K. pneumoniae* est sa capacité de résistance et de survie face aux stress environnementaux. Il a été montré précédemment qu'une pompe à efflux de la famille des SMR, la pompe MdtJI, est surexprimée dans les bactéries dispersées de biofilm de *K. pneumoniae* (Guilhen et al., 2016). Notre objectif était de déterminer le rôle potentiel de la pompe à efflux MdtJI dans la pathogénicité des bactéries dispersées, celles-ci ayant une pathogénicité augmentée comparativement aux bactéries sessiles ou planctoniques. Les bactéries dispersées ont notamment une capacité accrue de colonisation des surfaces biotiques et abiotiques comparativement aux bactéries planctoniques (Guilhen et al., 2019). Les systèmes d'efflux bactériens sont largement décrits pour leur implication dans les phénomènes de résistance aux antibiotiques, mais ils peuvent également jouer un rôle dans les processus de colonisation de surface et de formation de biofilm. En effet, ils sont capables de sécréter des composés entrant dans la composition de la matrice du biofilm ou encore des molécules signal responsables impliqués dans la formation de biofilm (Alav et al., 2018). Un mutant isogénique  $\Delta mdtJI$ , déficient dans l'expression de la pompe MdtJI, a été testé dans trois modèles expérimentaux de formation de biofilm. Seul l'un d'entre eux (plaque 96 puits et coloration au cristal violet) a mis en évidence une augmentation significative de la biomasse de biofilm du mutant. Nos observations sont en cohérence avec ce qui avait déjà été observé précédemment chez une souche d'*E. coli* où la délétion des gènes *mdtJ* ou *mdtI* conduit à une augmentation de la formation de biomasse de biofilm (Bay et al., 2017). Cette régulation peut potentiellement intervenir grâce à la l'excrétion, plus ou moins importante, par ces pompes de molécules régulatrices pouvant induire ou inhiber l'expression de gènes impliqués dans la formation de biofilm.-Ce phénomène a été observé chez *Acinetobacter baumannii* où la surexpression de pompes de la famille RND (AdeABC, AdeFGH and AdelJK) conduit à une réduction de la formation de biofilm par la bactérie via la sous-expression de gènes codant des systèmes fimbriaux (Yoon et al., 2015). On peut supposer que cette corrélation négative entre la surproduction de ces pompes et la diminution de la formation de biofilm résulte de l'export d'un composé qui est normalement nécessaire pour induire la formation de biofilm. Il est également possible que la pompe MdtJI de *K. pneumoniae* excrète de molécules impliquées dans la dispersion du biofilm, et donc que l'opéron *mdtJI* joue potentiellement un rôle dans les processus de dispersion plutôt que dans la formation de biofilm. Bien qu'aucun lien clair n'ait encore été établi entre les pompes à efflux et la dispersion, il semble probable que certains systèmes d'efflux sont impliqués dans le transport de composés induisant ce phénomène de dispersion. L'influence de cette pompe à efflux sur la solidité du biofilm de la souche sauvage, du mutant  $\Delta mdtJI$  et du mutant transcomplémenté a été évaluée dans un modèle de biofilm soumis à une étape de sonication : aucune

différence de solidité de biofilm n'a pu être observée entre les trois souches. La solidité du biofilm pourrait être mesurée par une autre approche expérimentale plus précise qui consisterait à observer dans un système microfluidique (BioFlux®) le comportement des biofilms exposés à des forces de cisaillement d'intensité et de durée contrôlées. Enfin, le rôle de la pompe MdtJI dans le processus de dispersion pour être analysé en comparant les capacités de dispersion de la souche sauvage et du mutant  $\Delta mdtJI$  ; pour cela, des biofilms mixtes (sauvage / mutant) seraient formés dans des systèmes de culture en flux tels que les systèmes « flow-cells », et la proportion de chacune des souches dans l'effluent serait déterminée.

La pompe à efflux MdtJI a récemment été identifiée par Willsey *et al.* comme étant impliquée dans la survie de *K. pneumoniae* au niveau pulmonaire dans un modèle murin *in vivo*. Néanmoins, le mécanisme par lequel elle favorise la survie bactérienne dans ce site infectieux n'a pas été mis en évidence (Willsey *et al.*, 2018). L'une des fonctions primaires de la pompe MdtJI est l'excrétion de composés polyamines, notamment la spermidine et la putrescine. Ces composés polyamines ont été reconnus comme des médiateurs importants de la virulence chez différents genres bactériens, notamment *Shigella*, *Salmonella* et *Staphylococcus*, ce qui pourrait expliquer le phénotype observé au niveau pulmonaire (Di Martino *et al.*, 2013; Willsey *et al.*, 2018). De plus, au sein des poumons, la réponse immunitaire de l'hôte est relativement forte et les bactéries doivent lutter contre diverses cellules immunitaires, et notamment la lyse par les macrophages. Dans notre étude, nous avons mesuré le pourcentage de phagocytose et de survie du mutant  $\Delta mdtJI$  dans une lignée de macrophages J774. Nous avons ainsi pu montrer que l'absence de la pompe MdtJI conduit à une augmentation de la phagocytose des bactéries mais à une diminution de leur survie intracellulaire. Un des stress majeurs rencontré par le pathogène en présence de macrophages est le stress oxydatif. Nous avons ainsi analysé le rôle de la pompe MdtJI dans la résistance au stress oxydatif ; nous n'avons montré de différences entre les capacités de résistance du mutant  $\Delta mdtJI$  et de la souche sauvage au peroxyde d'hydrogène. Il a précédemment été montré que l'excrétion de certaines polyamines (spermidine, spermine, acetylspermidine, acetylspermine) peut interférer avec la réponse immunitaire de l'hôte en conduisant au dysfonctionnement de cellules de l'immunité, notamment via l'induction de l'apoptose des macrophages alvéolaires et des neutrophiles polynucléaires par cytotoxicité (Lasbury *et al.*, 2007; Mariggiò *et al.*, 2004). Ainsi, il serait intéressant d'analyser la survie du mutant *K. pneumoniae*  $\Delta mdtJI$  dans d'autres lignées cellulaires de l'immunité, et de mesurer l'apoptose des macrophages au contact des bactéries.

Que ce soit au niveau du tissu cellulaire de l'hôte ou dans l'environnement, lorsque les bactéries présentes au sein d'un biofilm se détachent, elles se retrouvent confrontées aux stress extérieurs. Outre les composés polyamines qui sont présents aussi bien dans les cellules procaryotes qu'eucaryotes, le système MdtJI est également capable de prendre en charge des détergents comme

le deoxycholate et le SDS chez *E. coli* (Higashi et al., 2008; Leuzzi et al., 2015; Nishino and Yamaguchi, 2001). Afin d'identifier les composés spécifiquement pris en charge par la pompe à efflux MdtJI chez *K. pneumoniae*, un screening via l'outil Phenotype Microarray de Biolog a été réalisé. Plusieurs substrats pour lesquels des différences de croissance entre le mutant  $\Delta mdtJI$  et la souche sauvage ont été identifiés lors du screening, mais la confirmation *in vitro* de l'impact de ces substrats sur la croissance a permis de valider seulement deux molécules antibiotiques : le cefotaxime et la ceftioxime. Le cefotaxime et la ceftioxime sont deux céphalosporines de la famille d'antibiotique des  $\beta$ -lactamines, dont l'activité antimicrobienne consiste en l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane. La résistance au  $\beta$ -lactamines chez *K. pneumoniae* est majoritairement médiée par la production d'enzyme telle que les  $\beta$ -lactamases, mais peut dans de plus faible proportion résulter de l'activité de systèmes d'efflux, et notamment la pompe AcrAB-TolC. Bialek-Davenet et al. ont montré que la résistance de *K. pneumoniae* pour la ceftioxime ne résulte pas de la surexpression d'AcrAB mais potentiellement d'autres système d'efflux (Bialek-Davenet et al., 2011). Au vu du large spectre d'antibiotique pouvant être transporté par les pompes SMR, nos résultats ne sont pas surprenants mais sont la première évidence de l'excrétion de la cefotaxime et la ceftioxime par une pompe cette famille SMR.

Nos résultats ne permettent pas d'expliquer précisément le rôle de la pompe à efflux MdtJI dans la physiologie de *K. pneumoniae*. Le rôle de cette pompe à efflux chez *K. pneumoniae* semble cependant être relié à une activité plus complexe qu'une résistance antimicrobienne.

Ce travail de thèse visait à étudier deux facteurs potentiellement impliqués dans la pathogénicité de *K. pneumoniae* : le fimbriae Kpg et la pompe à efflux MdtJI. Ces deux facteurs bactériens semblent impliqués dans la formation de biofilm *in vitro*, mais les mécanismes moléculaires sous-jacents n'ont pas pu être identifiés. Le processus de virulence et de formation de biofilm chez un pathogène comme *K. pneumoniae* sont souvent multifactoriels et résultent de l'action plusieurs mécanismes et facteurs de pathogénicité ; cela explique en partie la difficulté de leur compréhension. Ainsi, l'approche expérimentale qui consiste à observer les phénotypes de mutants de délétion peut s'avérer délicate. L'étude de nouveaux déterminants de la virulence est complexe au regard de la diversité de niches écologiques pouvant être colonisées par *K. pneumoniae*, et la multiplicité des rôles joués par certains facteurs. Les souches cliniques de *K. pneumoniae* sont divisées en deux groupes, les souches dites classiques et les souches hypervirulentes. Une grande partie des études actuelles se concentrent sur l'étude de quelques clones de *K. pneumoniae*, principalement hypervirulents, négligeant l'hétérogénéité au sein de l'espèce. Or, il est important de rappeler que *Klebsiella* est un pathogène opportuniste pouvant vivre dans divers sites dont des environnements naturels. Sur l'ensemble des éléments génétiques portés par le génome, beaucoup ne sont pas ou peu transcrit lors de l'implantation de la bactérie dans certains environnements spécifiques mais restent présents pour une éventuelle adaptation à un environnement différent. Ainsi, même les déterminants identifiés chez des



souches cliniques de *K. pneumoniae*, bien que pouvant être associés à un processus physiologique lié à la virulence chez l'hôte, n'ont pas forcément une fonction première dans ce type de site. Pour cette raison, il serait intéressant d'évaluer le rôle de la pompe MdtJI et des fimbriae Kpg sur la fitness et le phénotype des bactéries lorsqu'elles s'implantent dans l'environnement. Cela a été initié avec le fimbriae Kpg qui a été testé pour ses capacités d'adhésion sur des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* mais n'a pas montré être impliqué dans ce processus (Khater et al., 2015).

La prise en compte de la pluralité de fonctions de beaucoup de facteurs bactérien et l'analyse du rôle des nouveaux facteurs dans des environnements autres que les sites infectieux de l'organisme hôte serait judicieux pour une meilleure compréhension des phénomènes de transmission dans un contexte de santé globale.

---

## Références bibliographiques

---

- van Aartsen, J.J., Stahlhut, S.G., Harrison, E.M., Crosatti, M., Ou, H.-Y., Krogfelt, K.A., Struve, C., and Rajakumar, K. (2012). Characterization of a novel chaperone/usher fimbrial operon present on KpGI-5, a methionine tRNA gene-associated genomic island in *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Microbiol* 12, 59.
- Abby, S.S., Néron, B., Ménager, H., Touchon, M., and Rocha, E.P.C. (2014). MacSyFinder: A Program to Mine Genomes for Molecular Systems with an Application to CRISPR-Cas Systems. *PLoS ONE* 9, e110726.
- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H.R., and Iwata, S. (2003). Structure and Mechanism of the Lactose Permease of *Escherichia coli*. *Science* 301, 610–615.
- Aertsen, A., and Michiels, C.W. (2004). Stress and How Bacteria Cope with Death and Survival. *Critical Reviews in Microbiology* 30, 263–273.
- Aires, J. (2011). Les systèmes d'efflux actifs bactériens: caractérisation et modélisation pour quelles perspectives ? *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* 164, 265–270.
- Aires, J.R., and Nikaido, H. (2005). Aminoglycosides Are Captured from both Periplasm and Cytoplasm by the AcrD Multidrug Efflux Transporter of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 187, 1923–1929.
- Alav, I., Sutton, J.M., and Rahman, K.M. (2018). Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*
- Alekshun, M.N., and Levy, S.B. (2007). Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* 128, 1037–1050.
- Allen, W.J., Phan, G., and Waksman, G. (2012). Pilus biogenesis at the outer membrane of Gram-negative bacterial pathogens. *Current Opinion in Structural Biology* 22, 500–506.
- Alonso, A., Morales, G., Escalante, R., Campanario, E., Sastre, L., and Martinez, J.L. (2004). Overexpression of the multidrug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas maltophilia* physiology. *J Antimicrob Chemother* 53, 432–434.
- Anand, T. (2020). Phage therapy for treatment of virulent *Klebsiella pneumoniae* infection in a mouse model. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 8. .
- Asensio, A., Oliver, A., González-Diego, P., Baquero, F., Pérez-Díaz, J.C., Ros, P., Cobo, J., Palacios, M., Lasheras, D., and Cantón, R. (2000). Outbreak of a Multiresistant *Klebsiella pneumoniae* Strain in an Intensive Care Unit: Antibiotic Use as Risk Factor for Colonization and Infection. *Clinical Infectious Diseases* 30, 55–60.
- Atarashi, K., Suda, W., Luo, C., Kawaguchi, T., Motoo, I., Narushima, S., Kiguchi, Y., Yasuma, K., Watanabe, E., Tanoue, T., et al. (2017). Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives T<sub>H</sub> 1 cell induction and inflammation. *Science* 358, 359–365.
- Athamna, A., Ofek, I., Keisari, Y., Dutton, G.G.S., and Sharon, N. (1991). Lectinophagocytosis of Encapsulated *Klebsiella pneumoniae* Mediated by Surface Lectins of Guinea Pig Alveolar Macrophages and Human Monocyte-Derived Macrophages. *Infect. Immun.* 59, 10. .
- Auda, I.G., Ali Salman, I.M., and Odah, J.Gh. (2020). Efflux pumps of Gram-negative bacteria in brief. *Gene Reports* 20, 100666.
- Austin, J.W., Sanders, G., Kay, W.W., and Collinson, S.K. (1998). Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* 162, 295–301.
- Bachman, M.A., Oyler, J.E., Burns, S.H., Caza, M., Lépine, F., Dozois, C.M., and Weiser, J.N. (2011). *Klebsiella pneumoniae* Yersiniabactin Promotes Respiratory Tract Infection through Evasion of Lipocalin 2. *Infect. Immun.* 79, 3309–3316.
- Bachman, M.A., Lenio, S., Schmidt, L., Oyler, J.E., and Weiser, J.N. (2012). Interaction of Lipocalin 2, Transferrin, and Siderophores Determines the Replicative Niche of *Klebsiella pneumoniae* during Pneumonia. *MBio* 3.
- Bachman, M.A., Breen, P., Deornellas, V., Mu, Q., Zhao, L., Wu, W., Cavalcoli, J.D., and Mobley, H.L.T. (2015). Genome-Wide Identification of *Klebsiella pneumoniae* Fitness Genes during Lung Infection. *MBio* 6, e00775-15.
- Båga, M., Norgren, M., and Normark, S. (1987). Biogenesis of *E. coli* Pap pili: papH, a minor pilin subunit involved in cell anchoring and length modulation. *Cell* 49, 241–251.
- Bagley, S.T. (1985a). Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect Control* 6, 52–58.
- Bagley, S.T. (1985b). Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect Control* 6, 52–58. .

- Bahat-Samet, E., Castro-Sowinski, S., and Okon, Y. (2004). Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters* 237, 195–203.
- Balestrino, D., Haagensen, J.A.J., Rich, C., and Forestier, C. (2005). Characterization of Type 2 Quorum Sensing in *Klebsiella pneumoniae* and Relationship with Biofilm Formation. *J Bacteriol* 187, 2870–2880.
- Balestrino, D., Ghigo, J.-M., Charbonnel, N., Haagensen, J.A.J., and Forestier, C. (2008). The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. *Environmental Microbiology* 10, 685–701.
- Barnes, H. (1990). *Oceanography And Marine Biology* (CRC Press).
- Barnhart, M.M., Pinkner, J.S., Soto, G.E., Sauer, F.G., Langermann, S., Waksman, G., Frieden, C., and Hultgren, S.J. (2000). PapD-like chaperones provide the missing information for folding of pilin proteins. *PNAS* 97, 7709–7714.
- Barnhart, M.M., Sauer, F.G., Pinkner, J.S., and Hultgren, S.J. (2003). Chaperone-Subunit-Usher Interactions Required for Donor Strand Exchange during Bacterial Pilus Assembly. *Journal of Bacteriology* 185, 2723–2730.
- Barraud, N., Schleheck, D., Klebensberger, J., Webb, J.S., Hassett, D.J., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2009a). Nitric Oxide Signaling in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Mediates Phosphodiesterase Activity, Decreased Cyclic Di-GMP Levels, and Enhanced Dispersal. *Journal of Bacteriology* 191, 7333–7342.
- Barraud, N., Storey, M.V., Moore, Z.P., Webb, J.S., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2009b). Nitric oxide-mediated dispersal in single- and multi-species biofilms of clinically and industrially relevant microorganisms. *Microb Biotechnol* 2, 370–378.
- Barre, S.L., and Haras, D. (2007). Rencontres avec les bactéries marines. *J. Soc. Biol.* 201, 281–289.
- Bäumler, A.J. (1997). The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends in Microbiology* 5, 318–322.
- Bäumler, A.J., Gilde, A.J., Tsolis, R.M., van der Velden, A.W., Ahmer, B.M., and Heffron, F. (1997). Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes. *J Bacteriol* 179, 317–322.
- Bay, D.C., Rommens, K.L., and Turner, R.J. (2008). Small multidrug resistance proteins: A multidrug transporter family that continues to grow. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778, 1814–1838.
- Bay, D.C., Stremick, C.A., Sliwski, C.J., and Turner, R.J. (2017). Secondary multidrug efflux pump mutants alter *Escherichia coli* biofilm growth in the presence of cationic antimicrobial compounds. *Research in Microbiology* 168, 208–221.
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagensen, J.A.J., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B., et al. (2004). Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Molecular Microbiology* 51, 659–674.
- Bengoechea, J.A., and Sa Pessoa, J. (2019). *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiol. Rev.* 43, 123–144.
- Berg, H.C., and Anderson, R.A. (1973). Bacteria Swim by Rotating their Flagellar Filaments. *Nature* 245, 380–382.
- Berne, C., Ducret, A., Hardy, G.G., and Brun, Y.V. (2015). Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. *Microbiol Spectr* 3.
- Bialek, S., Lavigne, J.-P., Chevalier, J., Marcon, E., Leflon-Guibout, V., Davin, A., Moreau, R., Pagès, J.-M., and Nicolas-Chanoine, M.-H. (2010). Membrane Efflux and Influx Modulate both Multidrug Resistance and Virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a *Caenorhabditis elegans* Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 4373–4378.
- Bialek-Davenet, S., Marcon, E., Leflon-Guibout, V., Lavigne, J.-P., Bert, F., Moreau, R., and Nicolas-Chanoine, M.-H. (2011). In Vitro Selection of ramR and soxR Mutants Overexpressing Efflux Systems by Fluoroquinolones as Well as Cefoxitin in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 2795–2802.
- Bielen, K., 'S Jongers, B., Malhotra-Kumar, S., Jorens, P.G., Goossens, H., and Kumar-Singh, S. (2017). Animal models of hospital-acquired pneumonia: current practices and future perspectives. *Ann. Transl. Med.* 5, 132–132.

- Bissonnette, L., Champetier, S., Buisson, J.P., and Roy, P.H. (1991). Characterization of the nonenzymatic chloramphenicol resistance (*cmIA*) gene of the  $\text{In}4$  integron of Tn1696: similarity of the product to transmembrane transport proteins. *J Bacteriol* 173, 4493–4502. .
- Blackburn, D., Husband, A., Saldaña, Z., Nada, R.A., Klena, J., Qadri, F., and Girón, J.A. (2009). Distribution of the *Escherichia coli* Common Pilus among Diverse Strains of Human Enterotoxigenic *E. coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 1781–1784.
- Blair, J.M., and Piddock, L.J. (2009). Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Current Opinion in Microbiology* 12, 512–519.
- Blehert, D.S., Palmer, R.J., Xavier, J.B., Almeida, J.S., and Kolenbrander, P.E. (2003). Autoinducer 2 Production by *Streptococcus gordonii* DL1 and the Biofilm Phenotype of a *luxS* Mutant Are Influenced by Nutritional Conditions. *Journal of Bacteriology* 185, 4851–4860.
- Bochner, B.R. (2001). Phenotype MicroArrays for High-Throughput Phenotypic Testing and Assay of Gene Function. *Genome Research* 11, 1246–1255.
- Bokranz, W., Wang, X., Tschäpe, H., and Römling, U. (2005). Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. *J Med Microbiol* 54, 1171–1182.
- Boland, T., Latour, R.A., and Stutzenberger, F.J. (2000). Molecular Basis of Bacterial Adhesion. In *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications*, Y.H. An, and R.J. Friedman, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 29–41.
- Boles, B.R., Thoendel, M., and Singh, P.K. (2005). Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Molecular Microbiology* 57, 1210–1223.
- Borges-Walmsley, M.I., McKeegan, K.S., and Walmsley, A.R. (2003). Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem J* 376, 313–338.
- Borths, E.L., Poolman, B., Hvorup, R.N., Locher, K.P., and Rees, D.C. (2005). In vitro functional characterization of BtuCD-F, the *Escherichia coli* ABC transporter for vitamin B12 uptake. *Biochemistry* 44, 16301–16309.
- Boyd, A., and Chakrabarty, A.M. (1994). Role of Alginate Lyase in Cell Detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 60, 5. .
- Bratu, S., Landman, D., George, A., Salvani, J., and Quale, J. (2009). Correlation of the expression of *acrB* and the regulatory genes *marA*, *soxS* and *ramA* with antimicrobial resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* endemic to New York City. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64, 278–283.
- Brindhadevi, K., LewisOscar, F., Mylonakis, E., Shanmugam, S., Verma, T.N., and Pugazhendhi, A. (2020). Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry* 96, 49–57.
- Brisse, S., and Verhoef, J. (2001). Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 915–924.
- Brisse, S., Grimont, F., and Grimont, P. (2006). The genus *Klebsiella*. *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd Edition 6. .
- Brisse, S., Fevre, C., Passet, V., Issenhuth-Jeanjean, S., Tournebize, R., Diancourt, L., and Grimont, P. (2009). Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization. *PLOS ONE* 4, e4982.
- Broug-Holub, E., Toews, G.B., van Iwaarden, J.F., Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Paine, R., and Standiford, T.J. (1997). Alveolar macrophages are required for protective pulmonary defenses in murine *Klebsiella pneumoniae*: elimination of alveolar macrophages increases neutrophil recruitment but decreases bacterial clearance and survival. *Infect. Immun.* 65, 1139–1146.
- Brown, M.H., Paulsen, I.T., and Skurray, R.A. (1999). The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Molecular Microbiology* 31, 394–395.
- Brown, R.L., Sequeira, R.P., and Clarke, T.B. (2017). The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signaling. *Nat. Commun.* 8, 1512.

- Buckley, A.M., Webber, M.A., Cooles, S., Randall, L.P., La Ragione, R.M., Woodward, M.J., and Piddock, L.J.V. (2006). The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cell Microbiol* 8, 847–856.
- Buffie, C.G., and Pamer, E.G. (2014). Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol* 31. .
- Bulger, J., MacDonald, U., Olson, R., Beanan, J., and Russo, T.A. (2017). Metabolite Transporter PEG344 Is Required for Full Virulence of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Strain hvKP1 after Pulmonary but Not Subcutaneous Challenge. *Infect. Immun.* 85, e00093-17.
- Burchall, J.J., Elwell, L.P., and Fling, M.E. (1982). Molecular mechanisms of resistance to trimethoprim. *Rev Infect Dis* 4, 246–254.
- Burmølle, M., Bahl, M.I., Jensen, L.B., Sørensen, S.J., and Hansen, L.H. (2008). Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in Enterobacteriaceae strains. *Microbiology (Reading)* 154, 187–195.
- Busch, A., and Waksman, G. (2012). Chaperone-usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367, 1112–1122.
- Caballero, S., Carter, R., Ke, X., Sušac, B., Leiner, I.M., Kim, G.J., Miller, L., Ling, L., Manova, K., and Pamer, E.G. (2015). Distinct but Spatially Overlapping Intestinal Niches for Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS Pathog* 11, e1005132.
- Camprubi, S., Merino, S., Bened, V.-J., and Tom, J.M. (1993). The role of the O-antigen lipopolysaccharide and capsule on an experimental *Klebsiella pneumoniae* infection of the rat urinary tract. *FEMS Microbiology Letters* 111, 9–13.
- Cao, F., Wang, X., Wang, L., Li, Z., Che, J., Wang, L., Li, X., Cao, Z., Zhang, J., Jin, L., et al. (2015). Evaluation of the Efficacy of a Bacteriophage in the Treatment of Pneumonia Induced by Multidrug Resistance *Klebsiella pneumoniae* in Mice. *BioMed Research International* 2015, 1–9.
- Capitani, G., Eidam, O., and Grütter, M.G. (2006a). Evidence for a novel domain of bacterial outer membrane ushers. *Proteins* 65, 816–823.
- Capitani, G., Eidam, O., Glockshuber, R., and Grütter, M.G. (2006b). Structural and functional insights into the assembly of type 1 pili from *Escherichia coli*. *Microbes and Infection* 8, 2284–2290.
- Carpentier, B., and Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 499–511.
- Carter, M.Q., Louie, J.W., Feng, D., Zhong, W., and Brandl, M.T. (2016). Curli fimbriae are conditionally required in *Escherichia coli* O157:H7 for initial attachment and biofilm formation. *Food Microbiology* 57, 81–89.
- Casewell, M., and Phillips, I. (1977). Hands as route of transmission for *Klebsiella* species. *Br Med J* 2, 1315–1317.
- Catalán-Nájera, J.C., Garza-Ramos, U., and Barrios-Camacho, H. (2017). Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? *Virulence* 8, 1111–1123.
- 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.)).
- Chan, Y.Y., and Chua, K.L. (2005). The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB-OprB Efflux Pump: Expression and Impact on Quorum Sensing and Virulence. *Journal of Bacteriology* 187, 4707–4719.
- Chapman, M.R., Robinson, L.S., Pinkner, J.S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S., and Hultgren, S.J. (2002). Role of *Escherichia coli* Curli Operons in Directing Amyloid Fiber Formation. *Science* 295, 851–855.
- Chattopadhyay, S., Tchesnokova, V., McVeigh, A., Kisiela, D.I., Dori, K., Navarro, A., Sokurenko, E.V., and Savarino, S.J. (2012). Adaptive Evolution of Class 5 Fimbrial Genes in Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Its Functional Consequences \*. *Journal of Biological Chemistry* 287, 6150–6158.
- Chen, K.-M., Chiang, M.-K., Wang, M., Ho, H.-C., Lu, M.-C., and Lai, Y.-C. (2014). The role of *pgaC* in *Klebsiella pneumoniae* virulence and biofilm formation. *Microbial Pathogenesis* 77, 89–99.
- Chen, Y.-J., Pornillos, O., Lieu, S., Ma, C., Chen, A.P., and Chang, G. (2007). X-ray structure of EmrE supports dual topology model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 18999–19004.

- Chen, Y.-T., Chang, H.-Y., Lai, Y.-C., Pan, C.-C., Tsai, S.-F., and Peng, H.-L. (2004). Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Gene* 337, 189–198.
- Cheng, R.A., and Wiedmann, M. (2021). Recent Advances in Our Understanding of the Diversity and Roles of Chaperone-Usher Fimbriae in Facilitating *Salmonella* Host and Tissue Tropism. *Front Cell Infect Microbiol* 10.
- Chhibber, S., Aggarwal, S., and Yadav, V. (2003). Contribution of capsular and lipopolysaccharide antigens to the pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae* respiratory tract infection. *Folia Microbiol* 48, 699–702.
- Chhibber, S., Wadhwa, S., and Yadav, V. (2004). Protective role of liposome incorporated lipopolysaccharide antigen of *Klebsiella pneumoniae* in a rat model of lobar pneumonia. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 57, 150–155. .
- Chhibber, S., Kaur, S., and Kumari, S. (2008). Therapeutic potential of bacteriophage in treating *Klebsiella pneumoniae* B5055-mediated lobar pneumonia in mice. *J. Med. Microbiol.* 57, 1508–1513.
- Choby, J.E., Howard-Anderson, J., and Weiss, D.S. (2020). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* – clinical and molecular perspectives. *Journal of Internal Medicine* 287, 283–300.
- Choudhury, D., Thompson, A., Stojanoff, V., Langermann, S., Pinkner, J., Hultgren, S.J., and Knight, S.D. (1999). X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 285, 1061–1066.
- Chow, J., and Mazmanian, S.K. (2010). A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation. *Cell Host Microbe* 7, 265–276.
- Christensen, B.B., Sternberg, C., Andersen, J.B., Eberl, L., Møller, S., Givskov, M., and Molin, S. (1998). Establishment of New Genetic Traits in a Microbial Biofilm Community. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2247–2255.
- Chua, S.L., Liu, Y., Yam, J.K.H., Chen, Y., Vejborg, R.M., Tan, B.G.C., Kjelleberg, S., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., and Yang, L. (2014). Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. *Nat Commun* 5, 4462.
- Chung, P.Y. (2016). The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 363.
- Chung, Y.J., and Saier, M.H. (2001). SMR-type multidrug resistance pumps. *Curr Opin Drug Discov Devel* 4, 237–245. .
- Chung, Y.J., and Saier, M.H. (2002). Overexpression of the *Escherichia coli* *sugE* gene confers resistance to a narrow range of quaternary ammonium compounds. *J Bacteriol* 184, 2543–2545.
- Chung, C.-H., Fen, S., Yu, S.-C., and Wong, H. (2016). Influence of *oxyR* on Growth, Biofilm Formation, and Mobility of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol* 82, 788–796.
- Chung, D.R., Lee, H., Park, M.H., Jung, S.-I., Chang, H.-H., Kim, Y.-S., Son, J.S., Moon, C., Kwon, K.T., Ryu, S.Y., et al. (2012). Fecal carriage of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strains closely related to liver abscess isolates in Koreans living in Korea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31, 481–486.
- Clarke, T.B. (2014). Early Innate Immunity to Bacterial Infection in the Lung Is Regulated Systemically by the Commensal Microbiota via Nod-Like Receptor Ligands. *Infect. Immun.* 82, 4596–4606.
- Clegg, S., and Murphy, C.N. (2016). Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum* 4.
- Conlan, S., Kong, H.H., and Segre, J.A. (2012). Species-level analysis of DNA sequence data from the NIH Human Microbiome Project. *PLoS One* 7, e47075.
- Cookson, A.L., Cooley, W.A., and Woodward, M.J. (2002). The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. *Int J Med Microbiol* 292, 195–205.
- Cordeiro, M.A., Werle, C.H., Milanez, G.P., and Yano, T. (2016). Curli fimbria: an *Escherichia coli* adhesin associated with human cystitis. *Braz J Microbiol* 47, 414–416.
- Cortés, G., de Astorza, B., Benedí, V.J., and Albertí, S. (2002a). Role of the *htrA* Gene in *Klebsiella pneumoniae* Virulence. *Infect. Immun.* 70, 4772–4776.

- Cortés, G., Borrell, N., de Astorza, B., Gómez, C., Sauleda, J., and Albertí, S. (2002b). Molecular Analysis of the Contribution of the Capsular Polysaccharide and the Lipopolysaccharide O Side Chain to the Virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a Murine Model of Pneumonia. *Infect. Immun.* *70*, 2583–2590.
- Costa, T.R.D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M.S., Redzej, A., Trokter, M., and Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* *13*, 343–359.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., and James, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* *176*, 2137–2142. .
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* *35*. .
- Coudeyras, S., Nakusi, L., Charbonnel, N., and Forestier, C. (2008). A Tripartite Efflux Pump Involved in Gastrointestinal Colonization by *Klebsiella pneumoniae* Confers a Tolerance Response to Inorganic Acid. *Infect. Immun.* *76*, 4633–4641.
- Courvalin, P. (2008). Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *J Intern Med* *264*, 4–16.
- Criscuolo, A., and Gribaldo, S. (2010). BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol Biol* *10*, 210.
- Cryz, S.J., Mortimer, P., Cross, A.S., Fürer, E., and Germanier, R. (1986). Safety and immunogenicity of a polyvalent *Klebsiella* capsular polysaccharide vaccine in humans. *Vaccine* *4*, 15–20.
- Cubero, M., Grau, I., Tubau, F., Pallarés, R., Dominguez, M.A., Liñares, J., and Ardanuy, C. (2016). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clones causing bacteraemia in adults in a teaching hospital in Barcelona, Spain (2007–2013). *Clin Microbiol Infect* *22*, 154–160.
- Cuthbertson, L., Kos, V., and Whitfield, C. (2010). ABC Transporters Involved in Export of Cell Surface Glycoconjugates. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* *74*, 341–362.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *97*, 6640–6645.
- Davey, M.E., and O’toole, G.A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* *64*, 847. .
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* *2*, 114–122.
- Davies, D.G. (2011). Biofilm Dispersion. In *Biofilm Highlights*,
- Davies, D.G., and Marques, C.N.H. (2009). A Fatty Acid Messenger Is Responsible for Inducing Dispersion in Microbial Biofilms. *J Bacteriol* *191*, 1393–1403.
- Davies, J., and Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* *74*, 417–433.
- Davin-Regli, A., Bolla, J.-M., James, C.E., Lavigne, J.-P., Chevalier, J., Garnotel, E., Molitor, A., and Pages, J.-M. (2008). Membrane Permeability and Regulation of Drug “Influx and Efflux” in Enterobacterial Pathogens. *Current Drug Targets* *9*, 750–759. .
- Davis, G.S., and Price, L.B. (2016). Recent Research Examining Links Among *Klebsiella pneumoniae* from Food, Food Animals, and Human Extraintestinal Infections. *Curr Envir Health Rpt* *3*, 128–135.
- Dawson, R.J.P., and Locher, K.P. (2006). Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* *443*, 180–185.
- De Araujo, C., Balestrino, D., Roth, L., Charbonnel, N., and Forestier, C. (2010). Quorum sensing affects biofilm formation through lipopolysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Research in Microbiology* *161*, 595–603.
- De Souza, G.H. de A. (2021). *In Vitro* and *In Vivo* antibacterial activity assays of carvacrol: A candidate for development of innovative treatments against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One* *16*, 12.
- Deng, J.C., Zeng, X., Newstead, M., Moore, T.A., Tsai, W.C., Thannickal, V.J., and Standiford, T.J. (2004). STAT4 Is a Critical Mediator of Early Innate Immune Responses against Pulmonary *Klebsiella* Infection. *J Immunol* *173*, 4075–4083.



- Deplano, A., Denis, O., Poirel, L., Hocquet, D., Nonhoff, C., Byl, B., Nordmann, P., Vincent, J.L., and Struelens, M.J. (2005). Molecular Characterization of an Epidemic Clone of Panantibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 43, 1198–1204.
- Deshpande, A., Hurless, K., Cadnum, J.L., Chesnel, L., Gao, L., Chan, L., Kundrapu, S., Polinkovsky, A., and Donskey, C.J. (2016). Effect of Fidaxomicin versus Vancomycin on Susceptibility to Intestinal Colonization with Vancomycin-Resistant Enterococci and *Klebsiella pneumoniae* in Mice. *Antimicrob. Agents Chemother* 60, 3988–3993.
- Di Martino, M.L., Campilongo, R., Casalino, M., Micheli, G., Colonna, B., and Prosseda, G. (2013). Polyamines: Emerging players in bacteria–host interactions. *International Journal of Medical Microbiology* 303, 484–491.
- Di Martino, P., Cafferini, N., Joly, B., and Darfeuille-Michaud, A. (2003). *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Research in Microbiology* 154, 9–16.
- Diago-Navarro, E., Calatayud-Baselga, I., Sun, D., Khairallah, C., Mann, I., Ulacia-Hernando, A., Sheridan, B., Shi, M., and Fries, B.C. (2017). Antibody-Based Immunotherapy To Treat and Prevent Infection with Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin. Vaccine Immunol.* 24, e00456-16.
- Diard, M., and Hardt, W.-D. (2017). Evolution of bacterial virulence. *FEMS Microbiology Reviews* 41, 679–697.
- Dickson, R.P., Erb-Downward, J.R., Falkowski, N.R., Hunter, E.M., Ashley, S.L., and Huffnagle, G.B. (2018). The Lung Microbiota of Healthy Mice Are Highly Variable, Cluster by Environment, and Reflect Variation in Baseline Lung Innate Immunity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 198, 497–508.
- Doig, P., Yao, R., Burr, D.H., Guerry, P., and Trust, T.J. (1996). An environmentally regulated pilus-like appendage involved in *Campylobacter* pathogenesis. *Molecular Microbiology* 20, 885–894.
- Domenico, P., Johanson, W.G., and Straus, D.C. (1982). Lobar pneumonia in rats produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 37, 327–335.
- Domenico, P., Salo, R.J., Cross, A.S., and Cunha, B.A. (1994). Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* 62, 4495–4499. .
- Dong, T., and Schellhorn, H.E. (2010). Role of RpoS in Virulence of Pathogens. *Infection and Immunity* 78, 887–897.
- Donlan, R.M., and Costerton, J.W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15, 167–193.
- Donskey, C.J. (2004). The Role of the Intestinal Tract as a Reservoir and Source for Transmission of Nosocomial Pathogens. *Clin. Infect. Dis* 39, 219–226.
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H.W., Pos, K.M., Piddock, L.J.V., and Luisi, B.F. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology* 16, 523–539.
- Duguid, J.P., Smith, I.W., Dempster, G., and Edmunds, P.N. (1955). Non-flagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *J Pathol Bacteriol* 70, 335–348.
- Dumas, A., Bernard, L., Poquet, Y., Lugo-Villarino, G., and Neyrolles, O. (2018). The role of the lung microbiota and the gut–lung axis in respiratory infectious diseases. *Cell Microbiol* 20, e12966. .
- Edwards, P.R., and Ewing, W.H. (1986). *Edwards and Ewing’s Identification of Enterobacteriaceae* (New York: Elsevier).
- Eidam, O., Dworkowski, F.S.N., Glockshuber, R., Grütter, M.G., and Capitani, G. (2008). Crystal structure of the ternary FimC–FimFt–FimDN complex indicates conserved pilus chaperone–subunit complex recognition by the usher FimD. *FEBS Letters* 582, 651–655.
- Elbaz, Y., Steiner-Mordoch, S., Danieli, T., and Schuldiner, S. (2004). *In vitro* synthesis of fully functional EmrE, a multidrug transporter, and study of its oligomeric state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 1519–1524.
- Elkins, C.A., and Nikaido, H. (2002). Substrate Specificity of the RND-Type Multidrug Efflux Pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* Is Determined Predominately by Two Large Periplasmic Loops. *Journal of Bacteriology* 184, 6490–6498.
- Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J., and Poole, K. (1998). Influence of the MexAB–OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 180, 5443–5447.

- Evrard, B., Balestrino, D., Dosgilbert, A., Bouya-Gachancard, J.-L.J., Charbonnel, N., Forestier, C., and Tridon, A. (2010). Roles of Capsule and Lipopolysaccharide O Antigen in Interactions of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity* 78, 210–219.
- Fader, R.C., and Davis, C.P. (1980). Effect of Piliation on *Klebsiella pneumoniae* Infection in Rat Bladders. *Infect. Immun.* 30, 554–561. .
- Fader, R.C., Avots-Avotins, A.E., and Davis, C.P. (1979). Evidence for pili-mediated adherence of *Klebsiella pneumoniae* to rat bladder epithelial cells in vitro. *Infect Immun* 25, 729–737.
- Fader, R.C., Duffy, L.K., Davis, C.P., and Kurosky, A. (1982). Purification and chemical characterization of type 1 pili isolated from *Klebsiella pneumoniae*. *J Biol Chem* 257, 3301–3305. .
- Fader, R.C., Gondesén, K., Tolley, B., Ritchie, D.G., and Moller, P. (1988). Evidence that in vitro adherence of *Klebsiella pneumoniae* to ciliated hamster tracheal cells is mediated by type 1 fimbriae. *Infect Immun* 56, 3011–3013.
- Fagundes, C.T., Amaral, F.A., Vieira, A.T., Soares, A.C., Pinho, V., Nicoli, J.R., Vieira, L.Q., Teixeira, M.M., and Souza, D.G. (2012). Transient TLR Activation Restores Inflammatory Response and Ability To Control Pulmonary Bacterial Infection in Germfree Mice. *J Immunol* 11. .
- Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (2006). *The Prokaryotes: Vol. 2: Ecophysiology and Biochemistry* (Springer Science & Business Media).
- Fang, C.-T., Chuang, Y.-P., Shun, C.-T., Chang, S.-C., and Wang, J.-T. (2004). A Novel Virulence Gene in *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Primary Liver Abscess and Septic Metastatic Complications. *Journal of Experimental Medicine* 199, 697–705.
- Fang, C.-T., Lai, S.-Y., Yi, W.-C., Hsueh, P.-R., Liu, K.-L., and Chang, S.-C. (2007). *Klebsiella pneumoniae* Genotype K1: An Emerging Pathogen That Causes Septic Ocular or Central Nervous System Complications from Pyogenic Liver Abscess. *Clinical Infectious Diseases* 45, 284–293.
- Favre-Bonté, S., Licht, T.R., Forestier, C., and Krogfelt, K.A. (1999). *Klebsiella pneumoniae* Capsule Expression Is Necessary for Colonization of Large Intestines of Streptomycin-Treated Mice. *Infect. Immun.* 67, 6152–6156.
- Fazili, T., Sharnogoe, C., Endy, T., Kiska, D., Javaid, W., and Polhemus, M. (2016). *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess: An Emerging Disease. *Am. J. Med. Sci.* 351, 297–304.
- Federici, L., Du, D., Walas, F., Matsumura, H., Fernandez-Recio, J., McKeegan, K.S., Borges-Walmsley, M.I., Luisi, B.F., and Walmsley, A.R. (2005). The Crystal Structure of the Outer Membrane Protein VceC from the Bacterial Pathogen *Vibrio cholerae* at 1.8 Å Resolution \*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 15307–15314.
- Ferenci, T., and Spira, B. (2007). Variation in Stress Responses within a Bacterial Species and the Indirect Costs of Stress Resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1113, 105–113.
- Fernández, L., and Hancock, R.E.W. (2012). Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 25, 661–681.
- Finn, R.D., Clements, J., and Eddy, S.R. (2011). HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res* 39, W29–W37.
- Fisher, J., Belasco, J.G., Charnas, R.L., Khosla, S., and Knowles, J.R. (1980).  $\beta$ -Lactamase Inactivation by Mechanism-Based Reagents. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 289, 309–319. .
- Flemming, H.-C. (1993). Biofilms and Environmental Protection. *Water Science and Technology* 27, 1–10.
- Flemming, H.-C. (2016). EPS—Then and Now. *Microorganisms* 4.
- Flemming, H.-C., and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623–633.
- Flensburg, J., and Sköld, O. (1987). Massive overproduction of dihydrofolate reductase in bacteria as a response to the use of trimethoprim. *Eur J Biochem* 162, 473–476.
- Fletcher, M. (1996). *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity* (John Wiley & Sons).
- 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, 269–284.

- Floyd, J.T., Kumar, S., Mukherjee, M.M., He, G., and Varela, M.F. (2013). 2. A review of the molecular mechanisms of drug efflux in pathogenic bacteria: A structure-function perspective. 52. .
- Fralick, J.A. (1996). Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178, 5803–5805.
- Fraser, G.M., and Hughes, C. (1999). Swarming motility. *Current Opinion in Microbiology* 2, 630–635.
- Frozens, R., Remaut, H., and Waksman, G. (2008). Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *The EMBO Journal* 27, 2271–2280.
- Fung, C.-P., Chang, F.-Y., Lin, J.-C., Ho, D.M.-T., Chen, C.-T., Chen, J.-H., Yeh, K.-M., Chen, T.-L., Lin, Y.-T., and Siu, L.K. (2011). Immune response and pathophysiological features of *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses in an animal model. *Lab Invest* 91, 1029–1039.
- Fung, C.-P., Lin, Y.-T., Lin, J.-C., Chen, T.-L., Yeh, K.-M., Chang, F.-Y., Chuang, H.-C., Wu, H.-S., Tseng, C.-P., and Siu, L.K. (2012). *Klebsiella pneumoniae* in Gastrointestinal Tract and Pyogenic Liver Abscess. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1322–1325.
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology* 13, 34–40.
- Garnett, J.A., Martinez-Santos, V.I., Saldana, Z., Pape, T., Hawthorne, W., Chan, J., Simpson, P.J., Cota, E., Puente, J.L., Giron, J.A., et al. (2012). Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 3950–3955.
- Garrett, W.S., Gallini, C.A., Yatsunenkov, T., Michaud, M., DuBois, A., Delaney, M.L., Punit, S., Karlsson, M., Bry, L., Glickman, J.N., et al. (2010). Enterobacteriaceae Act in Concert with the Gut Microbiota to Induce Spontaneous and Maternally Transmitted Colitis. *Cell Host Microbe* 8, 292–300.
- Gato, E., Vázquez-Ucha, J.C., Rumbo-Feal, S., Álvarez-Fraga, L., Vallejo, J.A., Martínez-Gutián, M., Beceiro, A., Ramos Vivas, J., Sola Campoy, P.J., Pérez-Vázquez, M., et al. (2020). Kpi, a chaperone-usher pili system associated with the worldwide-disseminated high-risk clone *Klebsiella pneumoniae* ST-15. *Proc Natl Acad Sci USA* 117, 17249–17259.
- Geibel, S., and Waksman, G. (2014). The molecular dissection of the chaperone-usher pathway. *Biochim Biophys Acta* 1843, 1559–1567.
- Geller, B.L., Li, L., Martinez, F., Sully, E., Sturge, C.R., Daly, S.M., Pybus, C., and Greenberg, D.E. (2018). Morpholino oligomers tested in vitro, in biofilm and in vivo against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73, 1611–1619.
- Gilbert, P., Das, J., and Foley, I. (1997). Biofilm Susceptibility to Antimicrobials. *Adv Dent Res.* 11, 160–167.
- Giltner, C.L., Nguyen, Y., and Burrows, L.L. (2012). Type IV Pilin Proteins: Versatile Molecular Modules. *Microbiol Mol Biol Rev* 76, 740–772.
- Girard, R., Perraud, M., Herriot, H.E., Prüss, A., Savey, A., Tikhomirov, E., Thuriaux, M., Vanhems, P., and Bernard, U.C. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 72. .
- Giuffrè, M., Bonura, C., Geraci, D.M., Saporito, L., Catalano, R., Di Noto, S., Nociforo, F., Corsello, G., and Mammina, C. (2013). Successful control of an outbreak of colonization by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing K. pneumoniae sequence type 258 in a neonatal intensive care unit, Italy. *Journal of Hospital Infection* 85, 233–236.
- Giuliodori, A.M., Gualerzi, C.O., Soto, S., Vila, J., and Tavío, M.M. (2007). Review on Bacterial Stress Topics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1113, 95–104.
- Gomes, A.É.I., Pacheco, T., Santos, C. da S. dos, Pereira, J.A., Ribeiro, M.L., Darrieux, M., and Ferraz, L.F.C. (2021). Functional Insights From Kpfr, a New Transcriptional Regulator of Fimbrial Expression That Is Crucial for *Klebsiella pneumoniae* Pathogenicity. *Front. Microbiol.* 11, 601921.
- Gonzalez-Ferrer, S., Peñalosa, H.F., Budnick, J.A., Bain, W.G., Nordstrom, H.R., Lee, J.S., and Van Tyne, D. (2021). Finding Order in the Chaos: Outstanding Questions in *Klebsiella pneumoniae* Pathogenesis. *Infect. Immun.* 89, e00693-20.

- Gorrie, C.L., Mirčeta, M., Wick, R.R., Edwards, D.J., Thomson, N.R., Strugnell, R.A., Pratt, N.F., Garlick, J.S., Watson, K.M., Pilcher, D.V., et al. (2017). Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. *Clin. Infect. Dis* 65, 208–215.
- Gottesman, M.M., Pastan, I., and Ambudkar, S.V. (1996). P-glycoprotein and multidrug resistance. *Current Opinion in Genetics & Development* 6, 610–617.
- Grall, N., Andremont, A., and Armand-Lefèvre, L. (2011). Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? *Journal des Anti-infectieux* 13, 87–102.
- Greenberger, M.J., Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Danforth, J.M., Goodman, R.E., and Standiford, T.J. (1995). Neutralization of IL-10 increases survival in a murine model of *Klebsiella pneumoniae*. *J Immunol* 155, 722–729.
- Gristina, A.G. (1987). Biomaterial-Centered Infection: Microbial Adhesion Versus Tissue Integration. *Science* 237, 1588–1595.
- Guilhen, C., Charbonnel, N., Parisot, N., Gueguen, N., Iltis, A., Forestier, C., and Balestrino, D. (2016). Transcriptional profiling of *Klebsiella pneumoniae* defines signatures for planktonic, sessile and biofilm-dispersed cells. *BMC Genomics* 17, 237.
- Guilhen, C., Forestier, C., and Balestrino, D. (2017). Biofilm dispersal: multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties: Biofilm dispersal: multiple strategies to disseminate. *Molecular Microbiology* 105, 188–210.
- Guilhen, C., Miquel, S., Charbonnel, N., Joseph, L., Carrier, G., Forestier, C., and Balestrino, D. (2019). Colonization and immune modulation properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilm-dispersed cells. *Npj Biofilms Microbiomes* 5, 25.
- Gupta, A. (2002). Hospital-acquired infections in the neonatal intensive care unit-*Klebsiella pneumoniae*. *Seminars in Perinatology* 26, 340–345.
- Güvener, Z.T., and Harwood, C.S. (2007). Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. *Mol Microbiol* 66, 1459–1473.
- Hahn, E., Wild, P., Hermanns, U., Sebbel, P., Glockshuber, R., Häner, M., Taschner, N., Burkhard, P., Aebi, U., and Müller, S.A. (2002). Exploring the 3D Molecular Architecture of *Escherichia coli* Type 1 Pili. *Journal of Molecular Biology* 323, 845–857.
- Hall-Stoodley, L., and Stoodley, P. (2002). Developmental regulation of microbial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 228–233.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., and Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2, 95–108.
- Hansen, L.H., Johannesen, E., Burmølle, M., Sørensen, A.H., and Sørensen, S.J. (2004). Plasmid-Encoded Multidrug Efflux Pump Conferring Resistance to Olaquinoxin in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 3332–3337.
- Hartman, B.J., and Tomasz, A. (1984). Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 158, 513–516.
- Hay, A.J., and Zhu, J. (2016). Chapter Two - In *Sickness and in Health: The Relationships Between Bacteria and Bile in the Human Gut*. In *Advances in Applied Microbiology*, S. Sariaslani, and G.M. Gadd, eds. (Academic Press), pp. 43–64.
- Hayashi, H., Seiki, H., Tsuneda, S., Hirata, A., and Sasaki, H. (2003). Influence of growth phase on bacterial cell electrokinetic characteristics examined by soft particle electrophoresis theory. *Journal of Colloid and Interface Science* 264, 565–568.
- He, X., Szweczyk, P., Karyakin, A., Evin, M., Hong, W.-X., Zhang, Q., and Chang, G. (2010). Structure of a cation-bound multidrug and toxic compound extrusion transporter. *Nature* 467, 991–994.
- Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 263–273.
- Hengge-Aronis, R. (2000). A role for the sigma S subunit of RNA polymerase in the regulation of bacterial virulence. *Adv Exp Med Biol* 485, 85–93.

- Hengge-Aronis, R., Klein, W., Lange, R., Rimmel, M., and Boos, W. (1991). Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* *173*, 7918–7924.
- Hennequin, C., and Forestier, C. (2007). Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. *Research in Microbiology* *158*, 339–347.
- Hennequin, C., and Forestier, C. (2009a). *oxyR*, a LysR-Type Regulator Involved in *Klebsiella pneumoniae* Mucosal and Abiotic Colonization. *Infect. Immun.* *77*, 5449–5457.
- Hennequin, C., and Forestier, C. (2009b). *oxyR*, a LysR-Type Regulator Involved in *Klebsiella pneumoniae* Mucosal and Abiotic Colonization. *IAI* *77*, 5449–5457.
- Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Heydorn, A., Andersen, J.B., Parsek, M.R., Rice, S.A., Eberl, L., Molin, S., Høiby, N., et al. (2002). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* *148*, 87–102.
- Herrmann, M., Vaudaux, P.E., Pittet, D., Auckenthaler, R., Lew, P.D., Perdreau, F.S., Peters, G., and Waldvogel, F.A. (1988). Fibronectin, Fibrinogen, and Laminin Act as Mediators of Adherence of Clinical Staphylococcal Isolates to Foreign Material. *The Journal of Infectious Diseases* *158*, 693–701.
- Heukelekian, H., and Heller, A. (1940). Relation between Food Concentration and Surface for Bacterial Growth. *J Bacteriol* *40*, 547–558. .
- Higashi, K., Ishigure, H., Demizu, R., Uemura, T., Nishino, K., Yamaguchi, A., Kashiwagi, K., and Igarashi, K. (2008). Identification of a Spermidine Excretion Protein Complex (MdtJl) in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* *190*, 872–878.
- Hirakata, Y., Srikumar, R., Poole, K., Gotoh, N., Suematsu, T., Kohno, S., Kamihira, S., Hancock, R.E.W., and Speert, D.P. (2002). Multidrug Efflux Systems Play an Important Role in the Invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Experimental Medicine* *196*, 109–118.
- Holden, V.I., Breen, P., Houle, S., Dozois, C.M., and Bachman, M.A. (2016). *Klebsiella pneumoniae* Siderophores Induce Inflammation, Bacterial Dissemination, and HIF-1 $\alpha$  Stabilization during Pneumonia. *MBio* *7*, e01397-16.
- Holt, K.E., Wertheim, H., Zadoks, R.N., Baker, S., Whitehouse, C.A., Dance, D., Jenney, A., Connor, T.R., Hsu, L.Y., Severin, J., et al. (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *PNAS* *112*, E3574.
- Honma, K., Mishima, E., Inagaki, S., and Sharma, A. (2009). The OxyR homologue in *Tannerella forsythia* regulates expression of oxidative stress responses and biofilm formation. *Microbiology* *155*, 1912–1922.
- Hori, K., and Matsumoto, S. (2010). Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal* *48*, 424–434.
- Hoyen, C.K., Pultz, N.J., Paterson, D.L., Aron, D.C., and Donskey, C.J. (2003). Effect of Parenteral Antibiotic Administration on Establishment of Intestinal Colonization in Mice by *Klebsiella pneumoniae* Strains Producing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother* *47*, 3610–3612.
- Hsieh, P., Lin, H., Lin, T., and Wang, J. (2010). CadC Regulates *cad* and *tdc* Operons in Response to Gastrointestinal Stresses and Enhances Intestinal Colonization of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* *202*, 52–64.
- Hsieh, P.-F., Lin, T.-L., Yang, F.-L., Wu, M.-C., Pan, Y.-J., Wu, S.-H., and Wang, J.-T. (2012). Lipopolysaccharide O1 Antigen Contributes to the Virulence in *Klebsiella pneumoniae* Causing Pyogenic Liver Abscess. *PLoS One* *7*, e33155.
- Hsieh, P.-F., Liu, J.-Y., Pan, Y.-J., Wu, M.-C., Lin, T.-L., Huang, Y.-T., and Wang, J.-T. (2013). *Klebsiella pneumoniae* Peptidoglycan-Associated Lipoprotein and Murein Lipoprotein Contribute to Serum Resistance, Antiphagocytosis, and Proinflammatory Cytokine Stimulation. *J. Infect. Dis.* *208*, 1580–1589.
- Hsieh, P.-F., Hsu, C.-R., Chen, C.-T., Lin, T.-L., and Wang, J.-T. (2016). The *Klebsiella pneumoniae* YfgL (BamB) lipoprotein contributes to outer membrane protein biogenesis, type-1 fimbriae expression, anti-phagocytosis, and *In Vivo* virulence. *Virulence* *7*, 587–601.
- Hsieh, P.-F., Lu, Y.-R., Lin, T.-L., Lai, L.-Y., and Wang, J.-T. (2019). *Klebsiella pneumoniae* Type VI Secretion System Contributes to Bacterial Competition, Cell Invasion, Type-1 Fimbriae Expression, and *In Vivo* Colonization. *J. Infect. Dis.* *219*, 637–647.

- Hsu, C.-R., Lin, T.-L., Chen, Y.-C., Chou, H.-C., and Wang, J.-T. (2011). The role of *Klebsiella pneumoniae* rmpA in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. *Microbiology* 157, 3446–3457.
- Hsu, C.-R., Pan, Y.-J., Liu, J.-Y., Chen, C.-T., Lin, T.-L., and Wang, J.-T. (2015). *Klebsiella pneumoniae* Translocates across the Intestinal Epithelium via Rho GTPase- and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-Dependent Cell Invasion. *Infect. Immun.* 83, 769–779.
- Hsu, C.-R., Chang, I.-W., Hsieh, P.-F., Lin, T.-L., Liu, P.-Y., Huang, C.-H., Li, K.-T., and Wang, J.-T. (2019). A Novel Role for the *Klebsiella pneumoniae* Sap (Sensitivity to Antimicrobial Peptides) Transporter in Intestinal Cell Interactions, Innate Immune Responses, Liver Abscess, and Virulence. *J. Infect. Dis.* 219, 1294–1306.
- Humphries, A.D., Raffatellu, M., Winter, S., Weening, E.H., Kingsley, R.A., Droleskey, R., Zhang, S., Figueiredo, J., Khare, S., Nunes, J., et al. (2003). The use of flow cytometry to detect expression of subunits encoded by 11 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial operons. *Molecular Microbiology* 48, 1357–1376.
- Hung, D.L., Knight, S.D., Woods, R.M., Pinkner, J.S., and Hultgren, S.J. (1996). Molecular basis of two subfamilies of immunoglobulin-like chaperones. *EMBO J* 15, 3792–3805. .
- Hung, D.L., Raivio, T.L., Jones, C.H., Silhavy, T.J., and Hultgren, S.J. (2001). Cpx signaling pathway monitors biogenesis and affects assembly and expression of P pili. *EMBO J* 20, 1508–1518.
- Hung, D.T., Zhu, J., Sturtevant, D., and Mekalanos, J.J. (2006). Bile acids stimulate biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology* 59, 193–201.
- Hürlimann, L.M., Hohl, M., and Seeger, M.A. (2017). Split tasks of asymmetric nucleotide-binding sites in the heterodimeric ABC exporter EfrCD. *FEBS J* 284, 1672–1687.
- Ishikawa, S.A., Zhukova, A., Iwasaki, W., and Gascuel, O. (2019). A Fast Likelihood Method to Reconstruct and Visualize Ancestral Scenarios. *Mol Biol Evol* 36, 2069–2085.
- Jack, D.L., Storms, M.L., Tchieu, J.H., Paulsen, I.T., and Saier, M.H. (2000). A Broad-Specificity Multidrug Efflux Pump Requiring a Pair of Homologous SMR-Type Proteins. *Journal of Bacteriology* 182, 2311–2313.
- Jacob-Dubuisson, F., Striker, R., and Hultgren, S.J. (1994). Chaperone-assisted self-assembly of pili independent of cellular energy. *J Biol Chem* 269, 12447–12455. .
- Jagnow, J., and Clegg, S. (2003). *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology (Reading)* 149, 2397–2405.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M.A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., and Kamil, M.A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association* 81, 7–11.
- James, C.E., Mahendran, K.R., Molitor, A., Bolla, J.-M., Bessonov, A.N., Winterhalter, M., and Pagès, J.-M. (2009). How  $\beta$ -Lactam Antibiotics Enter Bacteria: A Dialogue with the Porins. *PLOS ONE* 4, e5453.
- Jarvis, W.R., Munn, V.P., Highsmith, A.K., Culver, D.H., and Hughes, J.M. (1985). The Epidemiology of Nosocomial Infections Caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 6, 68–74.
- John, A.-K., Schmalzer, M., Khanna, N., and Landmann, R. (2011). Reversible Daptomycin Tolerance of Adherent Staphylococci in an Implant Infection Model  $\nabla$ . *Antimicrob Agents Chemother* 55, 3510–3516.
- Johnson, Z.L., and Chen, J. (2017). Structural Basis of Substrate Recognition by the Multidrug Resistance Protein MRP1. *Cell* 168, 1075-1085.e9.
- Johnson, J.R., Clabots, C., and Rosen, H. (2006). Effect of Inactivation of the Global Oxidative Stress Regulator oxyR on the Colonization Ability of *Escherichia coli* O1:K1:H7 in a Mouse Model of Ascending Urinary Tract Infection. *Infect. Immun.* 74, 461–468.
- Jones, R.N. (2010). Microbial Etiologies of Hospital-Acquired Bacterial Pneumonia and Ventilator-Associated Bacterial Pneumonia. *Clin. Infect. Dis* 51, S81–S87.
- Jones, C.H., Danese, P.N., Pinkner, J.S., Silhavy, T.J., and Hultgren, S.J. (1997). The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *EMBO J* 16, 6394–6406.
- Joo, H.-S., and Otto, M. (2012). Molecular basis of in-vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chem Biol* 19, 1503–1513.
- Joseph, L., Merciecca, T., Forestier, C., Balestrino, D., and Miquel, S. (2021). From *Klebsiella pneumoniae* Colonization to Dissemination: An Overview of Studies Implementing Murine Models. *Microorganisms* 9, 1282.

- Juhas, M. (2015). Horizontal gene transfer in human pathogens. *Critical Reviews in Microbiology* 41, 101–108.
- Jung, H.-J., Littmann, E.R., Seok, R., Leiner, I.M., Taur, Y., Peled, J., van den Brink, M., Ling, L., Chen, L., Kreiswirth, B.N., et al. (2019). Genome-Wide Screening for Enteric Colonization Factors in Carbapenem-Resistant ST258 *Klebsiella pneumoniae*. *MBio* 10, e02663-18.
- Kabha, K., Nissimov, L., Athamna, A., Keisari, Y., Parolis, H., Parolis, L.A., Grue, R.M., Schlepper-Schafer, J., Ezekowitz, A.R., and Ohman, D.E. (1995). Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 63, 847–852.
- Kalanuria, A.A., Zai, W., and Mirski, M. (2014). Ventilator-associated pneumonia in the ICU. 8. .
- Kaplan, J.B. (2010). Biofilm Dispersal. *J Dent Res* 89, 205–218.
- Karatan, E., and Watnick, P. (2009). Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 310–347.
- Katoh, K., and Standley, D.M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution* 30, 772–780.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., and Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 30, 3059–3066.
- Keisari, Y., Kabha, K., Nissimov, L., Schlepper-Schafer, J., and Ofek, I. (1997). Phagocyte-Bacteria Interactions. *Adv. Dent. Res.* 11, 43–49.
- Khater, F., Balestrino, D., Charbonnel, N., Dufayard, J.F., Brisse, S., and Forestier, C. (2015). In Silico Analysis of Usher Encoding Genes in *Klebsiella pneumoniae* and Characterization of Their Role in Adhesion and Colonization. *PLoS One* 10, e0116215.
- Kikuchi, T., Mizunoe, Y., Takade, A., Naito, S., and Yoshida, S. (2005). Curli Fibers Are Required for Development of Biofilm Architecture in *Escherichia coli* K-12 and Enhance Bacterial Adherence to Human Uroepithelial Cells. *Microbiology and Immunology* 49, 875–884.
- Kikukawa, T., Nara, T., Araiso, T., Miyauchi, S., and Kamo, N. (2006). Two-component bacterial multidrug transporter, EbrAB: Mutations making each component solely functional. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758, 673–679.
- Kim, S.-K., and Lee, J.-H. (2016). Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol.* 54, 71–85.
- King, T., Ishihama, A., Kori, A., and Ferenci, T. (2004). A Regulatory Trade-Off as a Source of Strain Variation in the Species *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 186, 5614–5620.
- Kislichkina, A.A., Lev, A.I., Komisarova, E.V., Fursova, N.K., Myakinina, V.P., Mukhina, T.N., Bogun, A.A., and Volozhantsev, N.V. (2017). Genome sequencing and comparative analysis of three hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Russia. *Pathog. Dis.* 75.
- Knittel, M.D., Seidler, R.J., Eby, C., and Cabe, L.M. (1977). Colonization of the botanical environment by *Klebsiella* isolates of pathogenic origin. *Appl Environ Microbiol* 34, 557–563.
- Ko, W.-C. (2002). Community-Acquired *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Global Differences in Clinical Patterns. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 160–166.
- Koita, K., and Rao, C.V. (2012). Identification and Analysis of the Putative Pentose Sugar Efflux Transporters in *Escherichia coli*. *PLOS ONE* 7, e43700.
- Korea, C.-G., Ghigo, J.-M., and Beloin, C. (2011). The sweet connection: Solving the riddle of multiple sugar-binding fimbrial adhesins in *Escherichia coli*: Multiple *E. coli* fimbriae form a versatile arsenal of sugar-binding lectins potentially involved in surface-colonisation and tissue tropism. *Bioessays* 33, 300–311.
- Kovaleva, J., Peters, F.T.M., Mei, H.C. van der, and Degener, J.E. (2013). Transmission of Infection by Flexible Gastrointestinal Endoscopy and Bronchoscopy. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 231–254.
- Krapp, F., Morris, A.R., Ozer, E.A., and Hauser, A.R. (2017). Virulence Characteristics of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains from Patients with Necrotizing Skin and Soft Tissue Infections. *Sci Rep* 7, 13533.
- Krasteva, P.V., Fong, J.C.N., Shikuma, N.J., Beyhan, S., Navarro, M.V.A.S., Yildiz, F.H., and Sondermann, H. (2010). *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. *Science* 327, 866–868.

- Kühnau, S., Reyes, M., Sievertsen, A., Shuman, H.A., and Boos, W. (1991). The activities of the *Escherichia coli* MalK protein in maltose transport, regulation, and inducer exclusion can be separated by mutations. *J Bacteriol* **173**, 2180–2186.
- Kuhner, M.K., and Felsenstein, J. (1994). A simulation comparison of phylogeny algorithms under equal and unequal evolutionary rates. *Mol Biol Evol* **11**, 459–468.
- Kuroda, T., and Tsuchiya, T. (2009). Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim Biophys Acta* **1794**, 763–768.
- Kusakizako, T., Miyauchi, H., Ishitani, R., and Nureki, O. (2020). Structural biology of the multidrug and toxic compound extrusion superfamily transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1862**, 183154.
- Kustu, S.G., and Ames, G.F. (1973). The hisP protein, a known histidine transport component in *Salmonella typhimurium*, is also an arginine transport component. *J Bacteriol* **116**, 107–113.
- Lagrafeuille, R., Miquel, S., Balestrino, D., Varelle-Delarbre, M., Chain, F., Langella, P., and Forestier, C. (2018). Opposing effect of *Lactobacillus* on *In vitro Klebsiella pneumoniae* in biofilm and in an *In Vivo* intestinal colonisation model. *Beneficial Microbes* **9**, 87–100.
- Lam, M.M.C., Wick, R.R., Wyres, K.L., and Holt, K.E. (2020). Genomic surveillance framework and global population structure for *Klebsiella pneumoniae*.
- Langermann, S., Möllby, R., Burlein, J.E., Palaszynski, S.R., Gale Auguste, C., DeFusco, A., Strouse, R., Schenerman, M.A., Hultgren, S.J., Pinkner, J.S., et al. (2000). Vaccination with FimH Adhesin Protects Cynomolgus Monkeys from Colonization and Infection by Uropathogenic *Eschevichia coli*. *J. Infect. Dis.* **181**, 774–778.
- Langton, K.P., Henderson, P.J.F., and Herbert, R.B. (2005). Antibiotic resistance: multidrug efflux proteins, a common transport mechanism? *Nat. Prod. Rep.* **22**, 439.
- Lasbury, M.E., Merali, S., Durant, P.J., Tschang, D., Ray, C.A., and Lee, C.-H. (2007). Polyamine-mediated apoptosis of alveolar macrophages during *Pneumocystis pneumonia*. *J Biol Chem* **282**, 11009–11020.
- Lau, H.Y., Clegg, S., and Moore, T.A. (2007). Identification of *Klebsiella pneumoniae* genes uniquely expressed in a strain virulent using a murine model of bacterial pneumonia. *Microbial Pathogenesis* **42**, 148–155.
- Lau, H.Y., Huffnagle, G.B., and Moore, T.A. (2008). Host and microbiota factors that control *Klebsiella pneumoniae* mucosal colonization in mice. *Microbes and Infection* **10**, 1283–1290.
- Laver, J.R., Hughes, S.E., and Read, R.C. (2015). Neisserial Molecular Adaptations to the Nasopharyngeal Niche. *Adv Microb Physiol* **66**, 323–355.
- Lawlor, M.S., Hsu, J., Rick, P.D., and Miller, V.L. (2005). Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model: *Klebsiella pneumoniae* intranasal STM. *Mol. Microbiol.* **58**, 1054–1073.
- Lawlor, M.S., Handley, S.A., and Miller, V.L. (2006). Comparison of the Host Responses to Wild-Type and cpsB Mutant *Klebsiella pneumoniae* Infections. *Infect. Immun.* **74**, 5402–5407.
- Lawlor, M.S., O'Connor, C., and Miller, V.L. (2007). Yersiniabactin Is a Virulence Factor for *Klebsiella pneumoniae* during Pulmonary Infection. *Infect. Immun.* **75**, 1463–1472.
- Lebaron, P., Bauda, P., Frank, N., Lett, M.C., Roux, B., Hubert, J.C., Duval-Iflah, Y., Simonet, P., Faurie, G., Normand, P., et al. (1997). Recombinant plasmid mobilization between *E. coli* strains in seven sterile microcosms. *Can. J. Microbiol.* **43**, 534–540.
- Lederman, E.R., and Crum, N.F. (2005). Pyogenic liver abscess with a focus on *Klebsiella pneumoniae* as a primary pathogen: an emerging disease with unique clinical characteristics. *Am J Gastroenterol* **100**, 322–331.
- Lee, C.-R., Lee, J.H., Park, K.S., Jeon, J.H., Kim, Y.B., Cha, C.-J., Jeong, B.C., and Lee, S.H. (2017). Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 483.
- Lee, S.F., Li, Y.H., and Bowden, G.H. (1996). Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. *Infect Immun* **64**, 1035–1038. .



- Lee, W.-H., Choi, H.-I., Hong, S.-W., Kim, K., Gho, Y.S., and Jeon, S.G. (2015). Vaccination with *Klebsiella pneumoniae*-derived extracellular vesicles protects against bacteria-induced lethality via both humoral and cellular immunity. *Exp Mol Med* 47, e183–e183.
- Lekshmi, M., Parvathi, A., Kumar, S., and Varela, M.F. (2018). Efflux Pump-Mediated Quorum Sensing: New Avenues for Modulation of Antimicrobial Resistance and Bacterial Virulence. In *Biotechnological Applications of Quorum Sensing Inhibitors*, V.C. Kalia, ed. (Singapore: Springer Singapore), pp. 127–142.
- Lery, L.M., Frangeul, L., Tomas, A., Passet, V., Almeida, A.S., Bialek-Davenet, S., Barbe, V., Bengoechea, J.A., Sansonetti, P., Brisse, S., et al. (2014). Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* genomes identifies a phospholipase D family protein as a novel virulence factor. *BMC Biology* 12, 41.
- Leuzzi, A., Di Martino, M.L., Campilongo, R., Falconi, M., Barbagallo, M., Marcocci, L., Pietrangeli, P., Casalino, M., Grossi, M., Micheli, G., et al. (2015). Multifactor Regulation of the MdtJ Polyamine Transporter in *Shigella*. *PLOS ONE* 10, e0136744.
- Levy, S.B., and McMurry, L. (1978). Plasmid-determined tetracycline resistance involves new transport systems for tetracycline. *Nature* 276, 90–92.
- Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Micro* 5, 48–56.
- Li, J. (2019). Isolation and characterization of a sequence type 25 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from the mid-south region of China. *BMC Microbiol* 10. .
- Li, X.-Z., and Nikaido, H. (2004). Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. *Drugs* 64, 159–204.
- Li, X.-Z., and Nikaido, H. (2009). Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. *Drugs* 69, 1555–1623.
- Li, Z., and Nair, S.K. (2012). Quorum sensing: How bacteria can coordinate activity and synchronize their response to external signals? *Protein Sci* 21, 1403–1417.
- Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., and Zhou, D. (2014a). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiology* 9, 1071–1081.
- Li, J., Attila, C., Wang, L., Wood, T.K., Valdes, J.J., and Bentley, W.E. (2007). Quorum Sensing in *Escherichia coli* Is Signaled by AI-2/LsrR: Effects on Small RNA and Biofilm Architecture. *J Bacteriol* 189, 6011–6020.
- Li, W., Sun, G., Yu, Y., Li, N., Chen, M., Jin, R., Jiao, Y., and Wu, H. (2014b). Increasing Occurrence of Antimicrobial-Resistant Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* Isolates in China. *BMC Microbiol* 8. .
- Liaquat, I., and Sakellaris, H. (2012). Biofilm formation and binding specificities of CFA/I, CFA/II and CS2 adhesions of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and CfaE-R181A mutant. *Braz. J. Microbiol.* 43, 969–980.
- Lillington, J., Geibel, S., and Waksman, G. (2014). Biogenesis and adhesion of type 1 and P pili. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840, 2783–2793.
- Lin, S.-H., Chung, P.-H., Wu, Y.-Y., Fung, C.-P., Hsu, C.-M., and Chen, L.-W. (2017). Inhibition of nitric oxide production reverses diabetes-induced Kupffer cell activation and *Klebsiella pneumoniae* liver translocation. *PLoS One* 12.
- Lin, Y.-T., Siu, L.K., Lin, J.-C., Chen, T.-L., Tseng, C.-P., Yeh, K.-M., Chang, F.-Y., and Fung, C.-P. (2012). Seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae* colonizing the intestinal tract of healthy chinese and overseas chinese adults in Asian countries. *BMC Microbiol* 12, 13.
- Linares, J.F., López, J.A., Camafeita, E., Albar, J.P., Rojo, F., and Martínez, J.L. (2005). Overexpression of the Multidrug Efflux Pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN Is Associated with a Reduction of Type III Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 187, 1384–1391.
- Lister, J.L., and Horswill, A.R. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4.
- Liu, J.Y., Miller, P.F., Willard, J., and Olson, E.R. (1999). Functional and Biochemical Characterization of *Escherichia coli* Sugar Efflux Transporters \*. *Journal of Biological Chemistry* 274, 22977–22984.
- Liu, X., Cao, B., Yang, L., and Gu, J.-D. (2022). Biofilm control by interfering with c-di-GMP metabolism and signaling. *Biotechnology Advances* 56, 107915.
- Livrelli, V., De Champs, C., Di Martino, P., Darfeuille-Michaud, A., Forestier, C., and Joly, B. (1996). Adhesive properties and antibiotic resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia* clinical isolates involved in nosocomial infections. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1963–1969. .

- Lonardi, E., Moonens, K., Buts, L., De Boer, A.R., Olsson, J.D.M., Weiss, M.S., Fabre, E., Guérardel, Y., Deelder, A.M., Oscarson, S., et al. (2013). Structural Sampling of Glycan Interaction Profiles Reveals Mucosal Receptors for Fimbrial Adhesins of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Biology* 2, 894–917.
- Long, F., Rouquette-Loughlin, C., Shafer, W.M., and Yu, E.W. (2008). Functional Cloning and Characterization of the Multidrug Efflux Pumps NorM from *Neisseria gonorrhoeae* and YdhE from *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, 3052–3060.
- Long, F., Su, C.-C., Lei, H.-T., Bolla, J.R., Do, S.V., and Yu, E.W. (2012). Structure and mechanism of the tripartite CusCBA heavy-metal efflux complex. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367, 1047–1058.
- Lou, W., Venkataraman, S., Zhong, G., Ding, B., Tan, J.P.K., Xu, L., Fan, W., and Yang, Y.Y. (2018). Antimicrobial polymers as therapeutics for treatment of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* lung infection. *Acta Biomaterialia* 78, 78–88.
- Low, A.S., Holden, N., Rosser, T., Roe, A.J., Constantinidou, C., Hobman, J.L., Smith, D.G.E., Low, J.C., and Gally, D.L. (2006). Analysis of fimbrial gene clusters and their expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Environ Microbiol* 8, 1033–1047.
- Lu, M., Radchenko, M., Symersky, J., Nie, R., and Guo, Y. (2013). Structural insights into H<sup>+</sup>-coupled multidrug extrusion by a MATE transporter. *Nat Struct Mol Biol* 20, 1310–1317.
- Ludden, C., Moradigaravand, D., Jamrozy, D., Gouliouris, T., Blane, B., Naydenova, P., Hernandez-Garcia, J., Wood, P., Hadjirin, N., Radakovic, M., et al. (2020). A One Health Study of the Genetic Relatedness of *Klebsiella pneumoniae* and Their Mobile Elements in the East of England. *Clinical Infectious Diseases* 70, 219–226.
- Lueschow, S.R., Stumphy, J., Gong, H., Kern, S.L., Elgin, T.G., Underwood, M.A., Kalanetra, K.M., Mills, D.A., Wong, M.H., Meyerholz, D.K., et al. (2018). Loss of murine Paneth cell function alters the immature intestinal microbiome and mimics changes seen in neonatal necrotizing enterocolitis. *PLoS One* 13, e0204967.
- Ma, Q., and Wood, T.K. (2009). OmpA influences *Escherichia coli* biofilm formation by repressing cellulose production through the CpxRA two-component system. *Environ Microbiol* 11, 2735–2746.
- Ma, D., Cook, D.N., Alberti, M., Pon, N.G., Nikaido, H., and Hearst, J.E. (1993). Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175, 6299–6313.
- Maayan, M.C., Ofek, I., Medalia, O., and Aronson, M. (1985). Population shift in mannose-specific fimbriated phase of *Klebsiella pneumoniae* during experimental urinary tract infection in mice. *Infect. Immun.* 49, 785–789.
- Magill, S.S., Edwards, J.R., Bamberg, W., Beldavs, Z.G., Dumyati, G., Kainer, M.A., Lynfield, R., Maloney, M., McAllister-Hollod, L., Nadle, J., et al. (2014). Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. *N Engl J Med* 370, 1198–1208.
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 18, 268–281.
- Malik-Kale, P., Parker, C.T., and Konkel, M.E. (2008). Culture of *Campylobacter jejuni* with Sodium Deoxycholate Induces Virulence Gene Expression. *J Bacteriol* 190, 2286–2297.
- Mamma, C., Palma, D.M., Bonura, C., Anna Plano, M.R., Monastero, R., Sodano, C., Calà, C., and Tetamo, R. (2010). Outbreak of Infection with *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 258 Producing *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 3 in an Intensive Care Unit in Italy. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 1506–1507.
- Marigiò, M.A., Vinella, A., Paschetto, N., Curci, E., Cassano, A., and Fumarulo, R. (2004). In vitro effects of polyamines on polymorphonuclear cell apoptosis and implications in the pathogenesis of periodontal disease. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 26, 93–101.
- Maroncle, N., Balestrino, D., Rich, C., and Forestier, C. (2002). Identification of *Klebsiella pneumoniae* Genes Involved in Intestinal Colonization and Adhesion Using Signature-Tagged Mutagenesis. *Infect. Immun.* 70, 4729–4734.

- Maroncle, N., Rich, C., and Forestier, C. (2006). The role of *Klebsiella pneumoniae* urease in intestinal colonization and resistance to gastrointestinal stress. *Research in Microbiology* 157, 184–193.
- Marques, C.N.H., Davies, D.G., and Sauer, K. (2015). Control of Biofilms with the Fatty Acid Signaling Molecule cis-2-Decenoic Acid. *Pharmaceuticals (Basel)* 8, 816–835.
- Martin, R.M., and Bachman, M.A. (2018). Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 4.
- Martin, R.M., Cao, J., Brisse, S., Passet, V., Wu, W., Zhao, L., Malani, P.N., Rao, K., and Bachman, M.A. (2016). Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *MSphere* 1, e00261-16.
- Martinez, J.L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution* 157, 2893–2902.
- Martínez, J.L., and Baquero, F. (2014). Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. *Upsala Journal of Medical Sciences* 119, 68–77.
- Matsen, J.M., Spindler, J.A., and Blosser, R.O. (1974). Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. *Appl Microbiol* 28, 672–678.
- Maunder, E., and Welch, M. (2017). Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters* 364.
- May, T., Ito, A., and Okabe, S. (2009). Induction of multidrug resistance mechanism in *Escherichia coli* biofilms by interplay between tetracycline and ampicillin resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 4628–4639.
- McGinnis, S., and Madden, T.L. (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research* 32, W20–W25.
- McKenney, P.T., Yan, J., Vaubourgeix, J., Becattini, S., Lampen, N., Motzer, A., Larson, P.J., Dannaoui, D., Fujisawa, S., Xavier, J.B., et al. (2019). Intestinal Bile Acids Induce a Morphotype Switch in Vancomycin-Resistant *Enterococcus* that Facilitates Intestinal Colonization. *Cell Host & Microbe* 25, 695-705.e5.
- McMurry, L., and Levy, S.B. (1978). Two Transport Systems for Tetracycline in Sensitive *Escherichia coli*: Critical Role for an Initial Rapid Uptake System Insensitive to Energy Inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 14, 201–209.
- Merino, S., Altarriba, M., Izquierdo, L., Nogueras, M.M., Regué, M., and Tomás, J.M. (2000). Cloning and Sequencing of the *Klebsiella pneumoniae* O5wb Gene Cluster and Its Role in Pathogenesis. *Infect. Immun.* 68, 2435–2440.
- Mi, W., Li, Y., Yoon, S.H., Ernst, R.K., Walz, T., and Liao, M. (2017). Structural basis of MsbA-mediated lipopolysaccharide transport. *Nature* 549, 233–237.
- Miele, V., Penel, S., and Duret, L. (2011). Ultra-fast sequence clustering from similarity networks with SiLiX. *BMC Bioinformatics* 12, 116.
- Miller, C.P., and Bohnhoff, M. (1963). Changes in the mouse's enteric microflora associated with enhanced susceptibility to *Salmonella* infection following streptomycin treatment. *J. Infect. Dis.* 113, 59–66.
- Mima, T., Joshi, S., Gomez-Escalada, M., and Schweizer, H.P. (2007). Identification and Characterization of TriABC-OpmH, a Triclosan Efflux Pump of *Pseudomonas aeruginosa* Requiring Two Membrane Fusion Proteins. *J Bacteriol* 189, 7600–7609.
- Minagawa, S., Inami, H., Kato, T., Sawada, S., Yasuki, T., Miyairi, S., Horikawa, M., Okuda, J., and Gotoh, N. (2012). RND type efflux pump system MexAB-OprM of *pseudomonas aeruginosa* selects bacterial languages, 3-oxoacyl-homoserine lactones, for cell-to-cell communication. *BMC Microbiol* 12, 70.
- Miquel, S., Lagrèfeuille, R., Souweine, B., and Forestier, C. (2016). Anti-biofilm Activity as a Health Issue. *Front Microbiol* 7.
- Mizgerd, J.P., and Skerrett, S.J. (2008). Animal models of human pneumonia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 294, L387–L398.

- Moore, T.A., Perry, M.L., Getsoian, A.G., Newstead, M.W., and Standiford, T.J. (2002). Divergent Role of Gamma Interferon in a Murine Model of Pulmonary versus Systemic *Klebsiella pneumoniae* Infection. *Infect. Immun.* **70**, 6310–6318.
- Morinaga, Y., Take, Y., Sasaki, D., Ota, K., Kaku, N., Uno, N., Sakamoto, K., Kosai, K., Miyazaki, T., Hasegawa, H., et al. (2019). Exploring the microbiota of upper respiratory tract during the development of pneumonia in a mouse model. *PLoS One* **14**.
- Morisaki, H., Nagai, S., Ohshima, H., Ikemoto, E., and Kogure, K.Y. 1999 (1999). The effect of motility and cell-surface polymers on bacterial attachment. *Microbiology* **145**, 2797–2802.
- Morita, Y., Kataoka, A., Shiota, S., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2000). NorM of *Vibrio parahaemolyticus* Is an Na<sup>+</sup>-Driven Multidrug Efflux Pump. *J Bacteriol* **182**, 6694–6697. .
- 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.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., and Yamaguchi, A. (2002). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**, 587–593.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T., and Yamaguchi, A. (2006). Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* **443**, 173–179.
- Murphy, C.N., and Clegg, S. (2012). *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiol* **7**, 991–1002.
- Murphy, C.N., Mortensen, M.S., Krogfelt, K.A., and Clegg, S. (2013). Role of *Klebsiella pneumoniae* Type 1 and Type 3 Fimbriae in Colonizing Silicone Tubes Implanted into the Bladders of Mice as a Model of Catheter-Associated Urinary Tract Infections. *Infect. Immun.* **81**, 3009–3017.
- Muth, T.R., and Schuldiner, S. (2000). A membrane-embedded glutamate is required for ligand binding to the multidrug transporter EmrE. *The EMBO Journal* **19**, 234–240.
- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., and Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, 252–275.
- Nealson, K.H., and Finkel, S.E. (2011). Electron flow and biofilms. *MRS Bulletin* **36**, 380–384.
- Neidhardt, F.C. (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology (Washington, D.C: ASM Press).
- Newell, P.D., Monds, R.D., and O’Toole, G.A. (2009). LapD is a bis-(3’,5’)-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3461–3466.
- Nguyen, T.-K., Duong, H.T.T., Selvanayagam, R., Boyer, C., and Barraud, N. (2015). Iron oxide nanoparticle-mediated hyperthermia stimulates dispersal in bacterial biofilms and enhances antibiotic efficacy. *Sci Rep* **5**.
- Nichols, W.W., Dorrington, S.M., Slack, M.P., and Walmsley, H.L. (1988). Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob Agents Chemother* **32**, 518–523. .
- Nichols, W.W., Evans, M.J., Slack, M.P.E., and Walmsley, H.L.Y. 1989 (1989). The Penetration of Antibiotics into Aggregates of Mucoid and Non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **135**, 1291–1303.
- Nickel, J.C., Ruseska, I., Wright, J.B., and Costerton, J.W. (1985). Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **27**, 619–624.
- Nies, D.H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **27**, 313–339.
- Nikaido, H. (2009). Multidrug Resistance in Bacteria. *Annual Review of Biochemistry* **78**, 119–146.
- Nikaido, H., and Hall, J.A. (1998). [1] Overview of bacterial ABC transporters. In *Methods in Enzymology*, (Academic Press), pp. 3–20.
- Nikaido, H., and Pagès, J.-M. (2012). Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **36**, 340–363.
- Nikaido, H., and Zgurskaya, H.I. (1999). Antibiotic efflux mechanisms. *Current Opinion in Infectious Diseases* **12**, 529–536. .

- Ninio, S., Rotem, D., and Schuldiner, S. (2001). Functional Analysis of Novel Multidrug Transporters from Human Pathogens. *Journal of Biological Chemistry* 276, 48250–48256.
- Nishino, K., and Yamaguchi, A. (2001). Analysis of a Complete Library of Putative Drug Transporter Genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 183, 5803–5812.
- Nishino, K., Latifi, T., and Groisman, E.A. (2006). Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 59, 126–141.
- Nishiyama, M., and Glockshuber, R. (2010). The outer membrane usher guarantees the formation of functional pili by selectively catalyzing donor-strand exchange between subunits that are adjacent in the mature pilus. *J Mol Biol* 396, 1–8.
- Nishiyama, M., Vetsch, M., Puorger, C., Jelesarov, I., and Glockshuber, R. (2003). Identification and characterization of the chaperone-subunit complex-binding domain from the type 1 pilus assembly platform FimD. *J Mol Biol* 330, 513–525.
- Normark, B.H., and Normark, S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine* 252, 91–106.
- Nuccio, S.-P., and Bäumlér, A.J. (2007). Evolution of the Chaperone/Usher Assembly Pathway: Fimbrial Classification Goes Greek. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 551–575.
- Oelschlaeger, T.A., Dobrindt, U., and Hacker, J. (2002). Virulence factors of uropathogens. *Curr Opin Urol* 12, 33–38.
- Ogawa, W., Koterawasa, M., Kuroda, T., and Tsuchiya, T. (2006). KmrA Multidrug Efflux Pump from *Klebsiella pneumoniae*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29, 550–553.
- Olivares, J., Alvarez-Ortega, C., Linares, J.F., Rojo, F., Köhler, T., and Martínez, J.L. (2012). Overproduction of the multidrug efflux pump MexEF-OprN does not impair *Pseudomonas aeruginosa* fitness in competition tests, but produces specific changes in bacterial regulatory networks. *Environmental Microbiology* 14, 1968–1981.
- Ong, C.Y., Beatson, S.A., Totsika, M., Forestier, C., McEwan, A.G., and Schembri, M.A. (2010). Molecular analysis of type 3 fimbrial genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella* and *Citrobacter* species. *BMC Microbiol* 10, 183.
- O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* 30, 295–304.
- Ottow, J.C. (1975). Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. *Annu Rev Microbiol* 29, 79–108.
- Paczosa, M.K., and Meccas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 629–661.
- Paczosa, M.K., Silver, R.J., McCabe, A.L., Tai, A.K., McLeish, C.H., Lazinski, D.W., and Meccas, J. (2020). Transposon Mutagenesis Screen of *Klebsiella pneumoniae* Identifies Multiple Genes Important for Resisting Antimicrobial Activities of Neutrophils in Mice. *Infect. Immun.* 88, e00034–20.
- Padilla, E., Llobet, E., Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Bengoechea, J.A., and Albertí, S. (2010). *Klebsiella pneumoniae* AcrAB Efflux Pump Contributes to Antimicrobial Resistance and Virulence. *Antimicrob. Agents Chemother* 54, 177–183.
- Pagès, J.-M., and Amaral, L. (2009). Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1794, 826–833.
- Palacios, M., Broberg, C.A., Walker, K.A., and Miller, V.L. (2017). A Serendipitous Mutation Reveals the Severe Virulence Defect of a *Klebsiella pneumoniae* *fepB* Mutant. *MSphere* 2, e00341-17.
- Palacios, M., Miner, T.A., Frederick, D.R., Sepulveda, V.E., Quinn, J.D., Walker, K.A., and Miller, V.L. (2018). Identification of Two Regulators of Virulence That Are Conserved in *Klebsiella pneumoniae* Classical and Hypervirulent Strains. *MBio* 9, e01443-18.
- Pan, P.-C., Chen, H.-W., Wu, P.-K., Wu, Y.-Y., Lin, C.-H., and Wu, J.H. (2011). Mutation in fucose synthesis gene of *Klebsiella pneumoniae* affects capsule composition and virulence in mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 236, 219–226.
- Panthier, J.-J., and Montagutelli, X. (2012). Le Collaborative Cross - Un outil révolutionnaire à l'assaut des caractères complexes. *Med Sci (Paris)* 28, 103–108.

- Paulsen, I.T., Skurray, R.A., Tam, R., Saier Jr, M.H., Turner, R.J., Weiner, J.H., Goldberg, E.B., and Grinius, L.L. (1996). The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Molecular Microbiology* 19, 1167–1175.
- Peña, C., Pujol, M., Ricart, A., Ardanuy, C., Ayats, J., Liñares, J., Garrigosa, F., Ariza, J., and Gudiol, F. (1997). Risk factors for faecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL-KP) in the intensive care unit. *J Hosp Infect* 35, 9–16.
- Peña, C., Suarez, C., Tubau, F., Juan, C., Moya, B., Dominguez, M.A., Oliver, A., Pujol, M., and Ariza, J. (2009). Nosocomial Outbreak of a Non-Cefepime-Susceptible Ceftazidime-Susceptible *Pseudomonas aeruginosa* Strain Overexpressing MexXY-OprM and Producing an Integron-Borne PSE-1  $\beta$ -Lactamase. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 2381–2387.
- Pendleton, J.N., Gorman, S.P., and Gilmore, B.F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 11, 297–308.
- Penny, D., and Hendy, M.D. (1985a). Testing Methods of Evolutionary Tree Construction. *Cladistics* 1, 266–278.
- Penny, D., and Hendy, M.D. (1985b). The Use of Tree Comparison Metrics. *Systematic Zoology* 34, 75–82.
- Percival, S.L., Suleman, L., Vuotto, C., and Donelli, G. (2015). Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *J. Med. Microbiol.* 64, 323–334.
- Perez, F., Pultz, M.J., Endimiani, A., Bonomo, R.A., and Donskey, C.J. (2011). Effect of Antibiotic Treatment on Establishment and Elimination of Intestinal Colonization by KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Mice. *Antimicrob. Agents Chemother* 55, 2585–2589.
- Pérez-Burgos, M., and Søggaard-Andersen, L. (2020). Biosynthesis and function of cell-surface polysaccharides in the social bacterium *Myxococcus xanthus*. *Biol Chem* 401, 1375–1387.
- Perez-Casal, J., Swartley, J.S., and Scott, J.R. (1990). Gene encoding the major subunit of CS1 pili of human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 58, 3594–3600.
- Perron, K., Caille, O., Rossier, C., Van Delden, C., Dumas, J.-L., and Köhler, T. (2004). CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 279, 8761–8768.
- Petrova, O.E., and Sauer, K. (2016). Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Current Opinion in Microbiology* 30, 67–78.
- Pettigrew, D., Anderson, K.L., Billington, J., Cota, E., Simpson, P., Urvil, P., Rabuzin, F., Roversi, P., Nowicki, B., Merle, L. du, et al. (2004). High Resolution Studies of the Afa/Dr Adhesin DraE and Its Interaction with Chloramphenicol \*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 46851–46857.
- Pettigrew, M.M., Marks, L.R., Kong, Y., Gent, J.F., Roche-Hakansson, H., and Hakansson, A.P. (2014). Dynamic Changes in the *Streptococcus pneumoniae* Transcriptome during Transition from Biofilm Formation to Invasive Disease upon Influenza A Virus Infection. *Infect Immun* 82, 4607–4619.
- Phan, G., Remaut, H., Wang, T., Allen, W.J., Pirker, K.F., Lebedev, A., Henderson, N.S., Geibel, S., Volkan, E., Yan, J., et al. (2011). Crystal structure of the FimD usher bound to its cognate FimC-FimH substrate. *Nature* 474, 49–53.
- Piatek, R., Zalewska, B., Bury, K., and Kur, J. (2005). The chaperone-usher pathway of bacterial adhesin biogenesis -- from molecular mechanism to strategies of anti-bacterial prevention and modern vaccine design. *Acta Biochim Pol* 52, 639–646.
- Piddock, L.J.V. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* 4, 629–636.
- Ping, Y., Ogawa, W., Kuroda, T., and Tsuchiya, T. (2007). Gene Cloning and Characterization of KdeA, a Multidrug Efflux Pump from *Klebsiella pneumoniae*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30, 1962–1964.
- Podschun, R., and Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin. Microbiol. Rev* 11, 589–603.
- Podschun, R., Pietsch, S., Höller, C., and Ullmann, U. (2001). Incidence of *Klebsiella* Species in Surface Waters and Their Expression of Virulence Factors. *Appl. Environ. Microbiol* 67, 3325–3327.

- Pomakova, D.K., Hsiao, C.-B., Beanan, J.M., Olson, R., MacDonald, U., Keynan, Y., and Russo, T.A. (2012). Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an emerging and under-recognized pathogenic variant. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31, 981–989.
- Poole, K. (2004). Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2200–2223.
- Poole, K. (2007). Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine* 39, 162–176.
- Pope, J.L., Yang, Y., Newsome, R.C., Sun, W., Sun, X., Ukhanova, M., Neu, J., Issa, J.-P., Mai, V., and Jobin, C. (2019). Microbial Colonization Coordinates the Pathogenesis of a *Klebsiella pneumoniae* Infant Isolate. *Sci Rep* 9, 3380.
- Pos, K.M. (2009). Trinity revealed: Stoichiometric complex assembly of a bacterial multidrug efflux pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 6893–6894.
- Pratt, L.A., and Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology* 30, 285–293.
- Prax, M., and Bertram, R. (2014). Metabolic aspects of bacterial persisters. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4.
- Proft, T., and Baker, E.N. (2009). Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria — structure, assembly and their role in disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 613–635.
- Putman, M., van Veen, H.W., and Konings, W.N. (2000). Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 672–693. .
- Radchenko, M., Symersky, J., Nie, R., and Lu, M. (2015). Structural basis for the blockade of MATE multidrug efflux pumps. *Nat Commun* 6, 7995.
- Radestock, S., and Forrest, L.R. (2011). The alternating-access mechanism of MFS transporters arises from inverted-topology repeats. *J Mol Biol* 407, 698–715.
- Rammaert, B., Goyet, S., Beauté, J., Hem, S., Te, V., Try, P.L., Mayaud, C., Borand, L., Buchy, P., Guillard, B., et al. (2012). *Klebsiella pneumoniae* related community- acquired acute lower respiratory infections in Cambodia: Clinical characteristics and treatment. *BMC Infect Dis* 7. .
- Ranaweera, I., Shrestha, U., Ranjana, K.C., Kakarla, P., Willmon, T.M., Hernandez, A.J., Mukherjee, M.M., Barr, S.R., and Varela, M.F. (2015). Structural comparison of bacterial multidrug efflux pumps of the major facilitator superfamily. *Trends Cell Mol Biol* 10, 131–140. .
- Rello, J., Rodriguez, R., Jubert, P., Alvarez, B., and Study Group for Severe Community-Acquired Pneumonia (1996). Severe Community-Acquired Pneumonia in the Elderly: Epidemiology and Prognosis. *Clin. Infect. Dis* 23, 723–728.
- Remaut, H., Rose, R.J., Hannan, T.J., Hultgren, S.J., Radford, S.E., Ashcroft, A.E., and Waksman, G. (2006). Donor-Strand Exchange in Chaperone-Assisted Pilus Assembly Proceeds through a Concerted  $\beta$  Strand Displacement Mechanism. *Molecular Cell* 22, 831–842.
- Reuter, A., Virolle, C., Goldlust, K., Berne-Dedieu, A., Nolivos, S., and Lesterlin, C. (2020). Direct visualisation of drug-efflux in live *Escherichia coli* cells. *FEMS Microbiology Reviews* 44, 782–792.
- Richards, J.J., and Melander, C. (2009). Controlling Bacterial Biofilms. *ChemBioChem* 10, 2287–2294.
- Riley, M., Abe, T., Arnaud, M.B., Berlyn, M.K.B., Blattner, F.R., Chaudhuri, R.R., Glasner, J.D., Horiuchi, T., Keseler, I.M., Kosuge, T., et al. (2006). *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot--2005. *Nucleic Acids Res* 34, 1–9.
- Roberts, A.P., Pratten, J., Wilson, M., and Mullany, P. (1999). Transfer of a conjugative transposon, Tn5397 in a model oral biofilm. *FEMS Microbiol Lett* 177, 63–66.
- Robinson, D.F., and Foulds, L.R. (1981). Comparison of phylogenetic trees. *Mathematical Biosciences* 53, 131–147.
- Rocha, E.P.C. (2006). Inference and analysis of the relative stability of bacterial chromosomes. *Mol Biol Evol* 23, 513–522.
- Rose, H.D., and Schreier, J. (1968). The effect of hospitalization and antibiotic therapy on the gram-negative fecal flora. *Am J Med Sci* 255, 228–236.

- Rosen, D.A., Pinkner, J.S., Jones, J.M., Walker, J.N., Clegg, S., and Hultgren, S.J. (2008a). Utilization of an Intracellular Bacterial Community Pathway in *Klebsiella pneumoniae* Urinary Tract Infection and the Effects of FimK on Type 1 Pilus Expression. *Infect. Immun.* **76**, 3337–3345.
- Rosen, D.A., Pinkner, J.S., Walker, J.N., Elam, J.S., Jones, J.M., and Hultgren, S.J. (2008b). Molecular Variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* FimH Affect Function and Pathogenesis in the Urinary Tract. *Infect. Immun.* **76**, 3346–3356.
- Rosen, D.A., Hung, C.-S., Kline, K.A., and Hultgren, S.J. (2008c). Streptozocin-Induced Diabetic Mouse Model of Urinary Tract Infection. *Infect. Immun.* **76**, 4290–4298.
- Rosen, D.A., Hilliard, J.K., Tiemann, K.M., Todd, E.M., Morley, S.C., and Hunstad, D.A. (2016). *Klebsiella pneumoniae* FimK Promotes Virulence in Murine Pneumonia. *J. Infect. Dis.* **213**, 649–658.
- Rosen, D.A., Twentyman, J., and Hunstad, D.A. (2017). High Levels of Cyclic Di-GMP in *Klebsiella pneumoniae* Attenuate Virulence in the Lung. *Infect. Immun.* **86**, e00647-17.
- Rossi, B., Gasperini, M.L., Leflon-Guibout, V., Gioanni, A., de Lastours, V., Rossi, G., Dokmak, S., Ronot, M., Roux, O., Nicolas-Chanoine, M.-H., et al. (2018). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in Cryptogenic Liver Abscesses, Paris, France. *Emerg Infect Dis* **24**, 221–229.
- Rossmann, F.S., Racek, T., Wobser, D., Puchalka, J., Rabener, E.M., Reiger, M., Hendrickx, A.P.A., Diederich, A.-K., Jung, K., Klein, C., et al. (2015). Phage-mediated Dispersal of Biofilm and Distribution of Bacterial Virulence Genes Is Induced by Quorum Sensing. *PLoS Pathog* **11**.
- Rossolini, G.M., Muscas, P., Chiesurin, A., and Satta, G. (1993). Analysis of the *Salmonella fim* gene cluster: identification of a new gene (*fimI*) encoding a fimbrin-like protein and located downstream from the *fimA* gene. *FEMS Microbiol Lett* **114**, 259–265.
- Runcharoen, C., Moradigaravand, D., Blane, B., Paksanont, S., Thammachote, J., Anun, S., Parkhill, J., Chantratita, N., and Peacock, S.J. (2017). Whole genome sequencing reveals high-resolution epidemiological links between clinical and environmental *Klebsiella pneumoniae*. *Genome Med* **9**, 6.
- Russo, T.A., and Marr, C.M. (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin. Microbiol. Rev* **32**, 42. .
- Russo, T.A., Olson, R., MacDonald, U., Metzger, D., Maltese, L.M., Drake, E.J., and Gulick, A.M. (2014). Aerobactin Mediates Virulence and Accounts for Increased Siderophore Production under Iron-Limiting Conditions by Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* **82**, 2356–2367.
- Russo, T.A., Olson, R., MacDonald, U., Beanan, J., and Davidson, B.A. (2015). Aerobactin, but Not Yersiniabactin, Salmochelin, or Enterobactin, Enables the Growth/Survival of Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* *Ex Vivo* and *In Vivo*. *Infect. Immun.* **83**, 3325–3333.
- Russo, T.A., Olson, R., Fang, C.-T., Stoesser, N., Miller, M., MacDonald, U., Hutson, A., Barker, J.H., La Hoz, R.M., Johnson, J.R., et al. (2018). Identification of Biomarkers for Differentiation of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from Classical *K. pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **56**, e00776-18.
- Saier, M.H. (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 354–411.
- Saier, J., Milton H., and Paulsen, I.T. (2001). Phylogeny of multidrug transporters. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **12**, 205–213.
- Sakellaris, H., and Scott, J.R. (1998). New tools in an old trade: CS1 pilus morphogenesis. *Mol Microbiol* **30**, 681–687.
- Sakellaris, H., Balding, D.P., and Scott, J.R. (1996). Assembly proteins of CS1 pili of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21**, 529–541.
- Sale, L., Jr., and Wood, W.B., Jr. (1947). Studies on the mechanism of recovery in pneumonia due to Friedländer's bacillus : I. The pathogenesis of experimental Friedländer's bacillus pneumonia. *J Exp Med* **86**, 239–248.
- Sale, L., Smith, M.R., and Wood, W.B. (1947). Studies on the mechanism of recovery in pneumonia due to Friedländer's bacillus : II. The effect of sulfonamide chemotherapy upon the pulmonary lesion of experimental Friedländer's bacillus pneumonia. *J Exp Med* **86**, 249–256.



- Salunkhe, P., Smart, C.H.M., Morgan, J.A.W., Panagea, S., Walshaw, M.J., Hart, C.A., Geffers, R., Tümmler, B., and Winstanley, C. (2005). A cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* displays enhanced virulence and antimicrobial resistance. *J Bacteriol* *187*, 4908–4920.
- Sana, T.G., Flaugnatti, N., Lugo, K.A., Lam, L.H., Jacobson, A., Baylot, V., Durand, E., Journet, L., Cascales, E., and Monack, D.M. (2016). *Salmonella* Typhimurium utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. *PNAS* *113*, E5044–E5051.
- Santé Publique France (2019). Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, mai-juin 2017. 270. .
- Sauer, F.G., Fütterer, K., Pinkner, J.S., Dodson, K.W., Hultgren, S.J., and Waksman, G. (1999). Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis. *Science* *285*, 1058–1061.
- Sauer, F.G., Pinkner, J.S., Waksman, G., and Hultgren, S.J. (2002a). Chaperone priming of pilus subunits facilitates a topological transition that drives fiber formation. *Cell* *111*, 543–551.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., and Davies, D.G. (2002b). *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology* *184*, 1140–1154.
- Sauer, K., Cullen, M.C., Rickard, A.H., Zeef, L.A.H., Davies, D.G., and Gilbert, P. (2004). Characterization of Nutrient-Induced Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm. *J Bacteriol* *186*, 7312–7326.
- Schembri, M.A., Kjærgaard, K., and Klemm, P. (2003). Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiology* *48*, 253–267.
- Schilling, J.D., Mulvey, M.A., and Hultgren, S.J. (2001). Structure and Function of *Escherichia coli* Type 1 Pili: New Insight into the Pathogenesis of Urinary Tract Infections. *The Journal of Infectious Diseases* *183*, S36–S40.
- Schindler, B.D., and Kaatz, G.W. (2016). Multidrug efflux pumps of Gram-positive bacteria. *Drug Resistance Updates* *27*, 1–13.
- Schjorring, S., Struve, C., and Kroghfelt, K.A. (2008). Transfer of antimicrobial resistance plasmids from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in the mouse intestine. *J. Antimicrob. Chemother.* *62*, 1086–1093.
- Schroll, C., Barken, K.B., Kroghfelt, K.A., and Struve, C. (2010). Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol* *10*, 179.
- Seeger, M.A., Schiefner, A., Eicher, T., Verrey, F., Diederichs, K., and Pos, K.M. (2006). Structural Asymmetry of AcrB Trimer Suggests a Peristaltic Pump Mechanism. *Science* *313*, 1295–1298.
- Seidler, R.J., Knittel, M.D., and Brown, C. (1975). Potential Pathogens in the Environment: Cultural Reactions and Nucleic Acid Studies on *Klebsiella pneumoniae* from Clinical and Environmental Sources. *Applied Microbiology* *29*, 819–825.
- Selden, R. (1971). Nosocomial *Klebsiella* Infections: Intestinal Colonization as a Reservoir. *Ann Intern Med* *74*, 657.
- Sequeira, R.P., McDonald, J.A.K., Marchesi, J.R., and Clarke, T.B. (2020). Commensal Bacteroidetes protect against *Klebsiella pneumoniae* colonization and transmission through IL-36 signalling. *Nat Microbiol* *5*, 304–313.
- Sharma, A., Gupta, V.K., and Pathania, R. (2019). Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *Indian J Med Res* *149*, 129–145.
- Shon, A.S., Bajwa, R.P.S., and Russo, T.A. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Virulence* *4*, 107–118.
- Slonim, L.N., Pinkner, J.S., Bändén, C.I., and Hultgren, S.J. (1992). Interactive surface in the PapD chaperone cleft is conserved in pilus chaperone superfamily and essential in subunit recognition and assembly. *The EMBO Journal* *11*, 4747–4756.
- Snyder, J.A., Haugen, B.J., Lockatell, C.V., Maroncle, N., Hagan, E.C., Johnson, D.E., Welch, R.A., and Mobley, H.L.T. (2005). Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* *73*, 7588–7596.
- Song, J.-H., Oh, W.S., Kang, C.-I., Chung, D.R., Peck, K.R., Ko, K.S., Yeom, J.S., Kim, C.K., Kim, S.W., Chang, H.-H., et al. (2008). Epidemiology and clinical outcomes of community-acquired pneumonia in adult patients in Asian countries: a prospective study by the Asian network for surveillance of resistant pathogens. *Int. J. Antimicrob. Agents* *31*, 107–114.

- Sonnhammer, E.L., Eddy, S.R., and Durbin, R. (1997). Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins* 28, 405–420.
- Soskine, M., Adam, Y., and Schuldiner, S. (2004). Direct Evidence for Substrate-induced Proton Release in Detergent-solubilized EmrE, a Multidrug Transporter \*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 9951–9955.
- Soto, S.M. (2013). Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* 4, 223–229.
- Srinivasan, V.B., and Rajamohan, G. (2013). KpnEF, a New Member of the *Klebsiella pneumoniae* Cell Envelope Stress Response Regulon, Is an SMR-Type Efflux Pump Involved in Broad-Spectrum Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57, 4449–4462.
- Srinivasan, V.B., Singh, B.B., Priyadarshi, N., Chauhan, N.K., and Rajamohan, G. (2014). Role of Novel Multidrug Efflux Pump Involved in Drug Resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *PLOS ONE* 9, e96288.
- Stahlhut, S.G., Struve, C., Krogfelt, K.A., and Reisner, A. (2012). Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65, 350–359.
- Stephen, J., Lekshmi, M., Ammini, P., Kumar, S.H., and Varela, M.F. (2022). Membrane Efflux Pumps of Pathogenic *Vibrio* Species: Role in Antimicrobial Resistance and Virulence. *Microorganisms* 10, 382.
- Stewart, P.S., and William Costerton, J. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* 358, 135–138.
- Storz, G., and Hengge-Aronis, R. (2000). *Bacterial stress responses* (Washington, D.C.: ASM Press).
- Struve, C., and Krogfelt, K.A. (2003). Role of capsule in *Klebsiella pneumoniae* virulence: lack of correlation between in vitro and *In vivo* studies. *FEMS Microbiol. Lett.* 218, 149–154.
- Struve, C., Forestier, C., and Krogfelt, K.A. (2003). Application of a novel multi-screening signature-tagged mutagenesis assay for identification of *Klebsiella pneumoniae* genes essential in colonization and infection. *Microbiology* 149, 167–176.
- Struve, C., Bojer, M., and Krogfelt, K.A. (2008). Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Type 1 Fimbriae by Detection of Phase Variation during Colonization and Infection and Impact on Virulence. *Infect. Immun.* 76, 4055–4065.
- Struve, C., Bojer, M., and Krogfelt, K.A. (2009). Identification of a Conserved Chromosomal Region Encoding *Klebsiella pneumoniae* Type 1 and Type 3 Fimbriae and Assessment of the Role of Fimbriae in Pathogenicity. *Infect. Immun.* 77, 5016–5024.
- Sun, J., Bankston, J.R., Payandeh, J., Hinds, T.R., Zagotta, W.N., and Zheng, N. (2014). Crystal structure of the plant dual-affinity nitrate transporter NRT1.1. *Nature* 507, 73–77.
- Svennerholm, A.M., Wennerås, C., Holmgren, J., McConnell, M.M., and Rowe, B. (1990). Roles of different coli surface antigens of colonization factor antigen II in colonization by and protective immunogenicity of enterotoxigenic *Escherichia coli* in rabbits. *Infection and Immunity* 58, 341–346.
- Tan, S., Gan, C., Li, R., Ye, Y., Zhang, S., Wu, X., Yang, Y.Y., Fan, W., and Wu, M. (2015). A novel chemosynthetic peptide with  $\beta$ -sheet motif efficiently kills *Klebsiella pneumoniae* in a mouse model. *Int J Nanomedicine* 10, 1045–1059.
- Tan, Y.H., Chen, Y., Chu, W.H.W., Sham, L.-T., and Gan, Y.-H. (2020). Cell envelope defects of different capsule-null mutants in K1 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* can affect bacterial pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 113, 889–905.
- Tanaka, Y., Hipolito, C.J., Maturana, A.D., Ito, K., Kuroda, T., Higuchi, T., Katoh, T., Kato, H.E., Hattori, M., Kumazaki, K., et al. (2013). Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. *Nature* 496, 247–251.
- Tang, H.-L., Chiang, M.-K., Liou, W.-J., Chen, Y.-T., Peng, H.-L., Chiou, C.-S., Liu, K.-S., Lu, M.-C., Tung, K.-C., and Lai, Y.-C. (2010). Correlation between *Klebsiella pneumoniae* carrying pLVPK-derived loci and abscess formation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29, 689–698.
- Tate, C.G., Ubarretxena-Belandia, I., and Baldwin, J.M. (2003). Conformational Changes in the Multidrug Transporter EmrE Associated with Substrate Binding. *Journal of Molecular Biology* 332, 229–242.

- Taur, Y., Xavier, J.B., Lipuma, L., Ubeda, C., Goldberg, J., Gobourne, A., Lee, Y.J., Dubin, K.A., Socci, N.D., Viale, A., et al. (2012). Intestinal Domination and the Risk of Bacteremia in Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clin. Infect. Dis* 55, 905–914.
- Thanassi, D.G., Cheng, L.W., and Nikaido, H. (1997). Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179, 2512–2518.
- Thanassi, D.G., Saulino, E.T., Lombardo, M.J., Roth, R., Heuser, J., and Hultgren, S.J. (1998). The PapC usher forms an oligomeric channel: implications for pilus biogenesis across the outer membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3146–3151.
- Thanassi, D.G., Stathopoulos, C., Karkal, A., and Li, H. (2005). Protein secretion in the absence of ATP: the autotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of Gram-negative bacteria (Review). *Molecular Membrane Biology* 22, 63–72.
- Then, R.L. (1982). Mechanisms of resistance to trimethoprim, the sulfonamides, and trimethoprim-sulfamethoxazole. *Rev Infect Dis* 4, 261–269.
- Tikhonova, E.B., Wang, Q., and Zgurskaya, H.I. (2002). Chimeric Analysis of the Multicomponent Multidrug Efflux Transporters from Gram-Negative Bacteria. *Journal of Bacteriology* 184, 6499–6507.
- Tinsley, C.R., Voulhoux, R., Beretti, J.-L., Tommassen, J., and Nassif, X. (2004). Three Homologues, Including Two Membrane-bound Proteins, of the Disulfide Oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*: EFFECTS ON BACTERIAL GROWTH AND BIOGENESIS OF FUNCTIONAL TYPE IV PILI \*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 27078–27087.
- Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D., Loh, E., Gripenland, J., Tiensuu, T., Vaitkevicius, K., et al. (2009). The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* 459, 950–956.
- Totsika, M., Heras, B., Wurpel, D.J., and Schembri, M.A. (2009). Characterization of Two Homologous Disulfide Bond Systems Involved in Virulence Factor Biogenesis in Uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *J Bacteriol* 191, 3901–3908.
- Touchon, M., Cury, J., Yoon, E.-J., Krizova, L., Cerqueira, G.C., Murphy, C., Feldgarden, M., Wortman, J., Clermont, D., Lambert, T., et al. (2014). The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. *Genome Biol Evol* 6, 2866–2882.
- Trosky, J.E., Liverman, A.D.B., and Orth, K. (2008). *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cellular Microbiology* 10, 557–565.
- Tu, Y.-C., Lu, M.-C., Chiang, M.-K., Huang, S.-P., Peng, H.-L., Chang, H.-Y., Jan, M.-S., and Lai, Y.-C. (2009). Genetic Requirements for *Klebsiella pneumoniae*-Induced Liver Abscess in an Oral Infection Model. *Infect. Immun.* 77, 2657–2671.
- Tuson, H.H., and Weibel, D.B. (2013). Bacteria-surface interactions. *Soft Matter* 9, 4368–4380.
- Ubarretxena-Belandia, I., and Tate, C.G. (2004). New insights into the structure and oligomeric state of the bacterial multidrug transporter EmrE: an unusual asymmetric homo-dimer. *FEBS Letters* 564, 234–238.
- Umsumarng, S., Pintha, K., Pitchakarn, P., Sastraruji, K., Sastraruji, T., Ung, A., Jatisatienr, A., Pyne, S., and Limtrakul, P. (2013). Inhibition of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by stemofoline derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin advpub*, c12-00967.
- Valenski, M.L., Harris, S.L., Spears, P.A., Horton, J.R., and Orndorff, P.E. (2003). The Product of the *fimI* gene is necessary for *Escherichia coli* type 1 pilus biosynthesis. *J Bacteriol* 185, 5007–5011.
- Valentini, M., and Filloux, A. (2016). Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. *J Biol Chem* 291, 12547–12555.
- Van der Waaij, D., Berghuis-de Vries, J.M., and Lekkerkerk-van der Wees, J.E.C. (1971). Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J. Hyg.* 69, 405–411.
- Van Dyk, T.K. (2008). Bacterial Efflux Transport in Biotechnology. In *Advances in Applied Microbiology*, (Academic Press), pp. 231–247.

- Vareille-Delarbre, M., Miquel, S., Garcin, S., Bertran, T., Balestrino, D., Evrard, B., and Forestier, C. (2019). Immunomodulatory Effects of *Lactobacillus plantarum* on Inflammatory Response Induced by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* *87*, e00570-19.
- Vats, N., and Lee, S.F. (2000). Active detachment of *Streptococcus mutans* cells adhered to epon–hydroxylapatite surfaces coated with salivary proteins in vitro. *Archives of Oral Biology* *45*, 305–314.
- Verger, D., Miller, E., Remaut, H., Waksman, G., and Hultgren, S. (2006). Molecular mechanism of P pilus termination in uropathogenic *Escherichia coli*. *EMBO Reports* *7*, 1228–1232.
- Vetsch, M., Puorger, C., Spirig, T., Grauschopf, U., Weber-Ban, E.U., and Glockshuber, R. (2004). Pilus chaperones represent a new type of protein-folding catalyst. *Nature* *431*, 329–333.
- Vieira, A.T., Rocha, V.M., Tavares, L., Garcia, C.C., Teixeira, M.M., Oliveira, S.C., Cassali, G.D., Gamba, C., Martins, F.S., and Nicoli, J.R. (2016). Control of *Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection and immunomodulation by oral treatment with the commensal probiotic *Bifidobacterium longum* 51A. *Microbes and Infection* *18*, 180–189.
- Visalli, M.A., Murphy, E., Projan, S.J., and Bradford, P.A. (2003). AcrAB Multidrug Efflux Pump Is Associated with Reduced Levels of Susceptibility to Tigecycline (GAR-936) in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* *47*, 665–669.
- Voegele, K., Sakellaris, H., and Scott, J.R. (1997). CooB plays a chaperone-like role for the proteins involved in formation of CS1 pili of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 13257–13261. .
- Volkan, E., Ford, B.A., Pinkner, J.S., Dodson, K.W., Henderson, N.S., Thanassi, D.G., Waksman, G., and Hultgren, S.J. (2012). Domain activities of PapC usher reveal the mechanism of action of an *Escherichia coli* molecular machine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, 9563–9568.
- Waksman, G., and Hultgren, S.J. (2009). Structural biology of the chaperone–usher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol* *7*, 765–774.
- Walker, K.A., Miner, T.A., Palacios, M., Trzilova, D., Frederick, D.R., Broberg, C.A., Sepúlveda, V.E., Quinn, J.D., and Miller, V.L. (2019). A *Klebsiella pneumoniae* Regulatory Mutant Has Reduced Capsule Expression but Retains Hypermucoviscosity. *MBio* *10*, 16. .
- Wang, M., Jeng, K.C., and Ping, L.I. (1999). Exogenous cytokine modulation or neutralization of interleukin-10 enhance survival in lipopolysaccharide-hyporesponsive C3H/HeJ mice with *Klebsiella* infection. *Immunology* *98*, 90–97.
- Watnick, P.I., Lauriano, C.M., Klose, K.E., Croal, L., and Kolter, R. (2001). The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol Microbiol* *39*, 223–235. .
- van der Weide, H., Cossío, U., Gracia, R., te Welscher, Y.M., ten Kate, M.T., van der Meijden, A., Marradi, M., Ritsema, J.A.S., Vermeulen-de Jongh, D.M.C., Storm, G., et al. (2020). Therapeutic Efficacy of Novel Antimicrobial Peptide AA139-Nanomedicines in a Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Pneumonia-Septicemia Model in Rats. *Antimicrob. Agents Chemother* *64*, e00517-20.
- Werneburg, G.T., and Thanassi, D.G. (2018). Pili Assembled by the Chaperone/Usher Pathway in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *EcoSal Plus* *8*.
- Werneburg, G.T., Henderson, N.S., Portnoy, E.B., Sarowar, S., Hultgren, S.J., Li, H., and Thanassi, D.G. (2015). The pilus usher controls protein interactions via domain masking and is functional as an oligomer. *Nat Struct Mol Biol* *22*, 540–546.
- Wilksch, J.J., Yang, J., Clements, A., Gabbe, J.L., Short, K.R., Cao, H., Cavaliere, R., James, C.E., Whitchurch, C.B., Schembri, M.A., et al. (2011). MrkH, a Novel c-di-GMP-Dependent Transcriptional Activator, Controls *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Formation by Regulating Type 3 Fimbriae Expression. *PLoS Pathog* *7*, e1002204.
- Willsey, G.G., Ventrone, S., Schutz, K.C., Wallace, A.M., Ribis, J.W., Suratt, B.T., and Wargo, M.J. (2018). Pulmonary Surfactant Promotes Virulence Gene Expression and Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* *86*, e00135-18.

- Winstone, T.L., Jidenko, M., Maire, M. le, Ebel, C., Duncalf, K.A., and Turner, R.J. (2005). Organic solvent extracted EmrE solubilized in dodecyl maltoside is monomeric and binds drug ligand. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 327, 437–445.
- Wolff, N.S., Jacobs, M.C., Haak, B.W., Roelofs, J.J.T.H., de Vos, A.F., Hugenholtz, F., and Wiersinga, W.J. (2020). Vendor effects on murine gut microbiota and its influence on lipopolysaccharide-induced lung inflammation and Gram-negative pneumonia. *Intensive Care Medicine Experimental* 8, 47.
- Wozniak, D.J., Wyckoff, T.J.O., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O’Toole, G.A., and Parsek, M.R. (2003). Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 7907–7912.
- Wu, J.H., and Tsai, C.G. (2005). Infectivity of Hepatic Strain *Klebsiella pneumoniae* in Diabetic Mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 230, 757–761.
- Wu, C.-C., Huang, Y.-J., Fung, C.-P., and Peng, H.-L. (2010). Regulation of the *Klebsiella pneumoniae* Kpc fimbriae by the site-specific recombinase Kpcl. *Microbiology* 156, 1983–1992.
- Wu, J.H., Wu, A.M., Tsai, C.G., Chang, X.-Y., Tsai, S.-F., and Wu, T.-S. (2008). Contribution of Fucose-Containing Capsules in *Klebsiella pneumoniae* to Bacterial Virulence in Mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 233, 64–70.
- Wu, K.-M., Li, L.-H., Yan, J.-J., Tsao, N., Liao, T.-L., Tsai, H.-C., Fung, C.-P., Chen, H.-J., Liu, Y.-M., Wang, J.-T., et al. (2009). Genome Sequencing and Comparative Analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a Strain Causing Liver Abscess and Meningitis. *JB* 191, 4492–4501.
- Wyres, K.L., and Holt, K.E. (2018). *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 45, 131–139.
- Wyres, K.L., Lam, M.M.C., and Holt, K.E. (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol* 18, 344–359.
- Xavier, K.B., and Bassler, B.L. (2003). LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Current Opinion in Microbiology* 6, 191–197.
- Yadav, V., Sharma, S., Harjai, K., Mohan, H., and Chhibber, S. (2005). Lipopolysaccharide-mediated protection against *Klebsiella pneumoniae*-induced lobar pneumonia: Intranasal vs. intramuscular route of immunization. *Folia Microbiol* 50, 83–86.
- Yamaguchi, A., Nakashima, R., and Sakurai, K. (2015). Structural basis of RND-type multidrug exporters. *Front Microbiol* 6, 327.
- Yamanaka, H., Kobayashi, H., Takahashi, E., and Okamoto, K. (2008). MacAB is involved in the secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* 190, 7693–7698.
- Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Konda, T., and Arakawa, Y. (2007). New Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Efflux Pump, QepA, Found in an *Escherichia coli* Clinical Isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 3354–3360.
- Yeh, K.-M., Lin, J.-C., Yin, F.-Y., Fung, C.-P., Hung, H.-C., Siu, L.-K., and Chang, F.-Y. (2010). Revisiting the Importance of Virulence Determinant magA and Its Surrounding Genes in *Klebsiella pneumoniae* Causing Pyogenic Liver Abscesses: Exact Role in Serotype K1 Capsule Formation. *J. Infect. Dis.* 201, 1259–1267.
- Yen, M.R., Peabody, C.R., Partovi, S.M., Zhai, Y., Tseng, Y.H., and Saier, M.H. (2002). Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1562, 6–31.
- Yerushalmi, H., and Schuldiner, S. (2000). An Essential Glutamyl Residue in EmrE, a Multidrug Antiporter from *Escherichia coli* \*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 5264–5269.
- Yerushalmi, H., Lebendiker, M., and Schuldiner, S. (1995). EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa Multidrug Transporter, Exchanges Toxic Cations and H<sup>+</sup> and Is Soluble in Organic Solvents (\*). *Journal of Biological Chemistry* 270, 6856–6863.
- Yerushalmi, H., Lebendiker, M., and Schuldiner, S. (1996). Negative Dominance Studies Demonstrate the Oligomeric Structure of EmrE, a Multidrug Antiporter from *Escherichia coli* \*. *Journal of Biological Chemistry* 271, 31044–31048.
- Yin, Y., He, X., Szewczyk, P., Nguyen, T., and Chang, G. (2006). Structure of the Multidrug Transporter EmrD from *Escherichia coli*. *Science* 312, 741–744.

- Yoneda, T., Sakata, H., Yamasaki, S., Hayashi-Nishino, M., and Nishino, K. (2022). Analysis of multidrug efflux transporters in resistance to fatty acid salts reveals a TolC-independent function of EmrAB in *Salmonella enterica*. *PLOS ONE* 17, e0266806.
- Yoon, E.-J., Chabane, Y.N., Goussard, S., Snesrud, E., Courvalin, P., Dé, E., and Grillot-Courvalin, C. (2015). Contribution of Resistance-Nodulation-Cell Division Efflux Systems to Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii*. *MBio* 6, e00309-15.
- Yoshida, K., Matsumoto, T., Tateda, K., Uchida, K., Tsujimoto, S., and Yamaguchi, K. (2000). Role of bacterial capsule in local and systemic inflammatory responses of mice during pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae*. *J. Med. Microbiol.* 49, 1003–1010. .
- Yoshida, K., Matsumoto, T., Tateda, K., Uchida, K., Tsujimoto, S., and Yamaguchi, K. (2001). Induction of interleukin-10 and down-regulation of cytokine production by *Klebsiella pneumoniae* capsule in mice with pulmonary infection. *J. Med. Microbiol.* 50, 456–461.
- Young, T.M., Bray, A.S., Nagpal, R.K., Caudell, D.L., Yadav, H., and Zafar, M.A. (2020). Animal Model To Study *Klebsiella pneumoniae* Gastrointestinal Colonization and Host-to-Host Transmission. *Infect. Immun.* 88, e00071-20.
- Zavialov, A., Zav'yalova, G., Korpela, T., and Zav'yalov, V. (2007). FGL chaperone-assembled fimbrial polyadhesins: anti-immune armament of Gram-negative bacterial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 31, 478–514.
- Zavialov, A.V., Tischenko, V.M., Fooks, L.J., Brandsdal, B.O., Åqvist, J., Zav'yalov, V.P., Macintyre, S., and Knight, S.D. (2005). Resolving the energy paradox of chaperone/usher-mediated fibre assembly. *Biochem J* 389, 685–694.
- Zav'yalov, V., Zavialov, A., Zav'yalova, G., and Korpela, T. (2010). Adhesive organelles of Gram-negative pathogens assembled with the classical chaperone/usher machinery: structure and function from a clinical standpoint. *FEMS Microbiology Reviews* 34, 317–378.
- Zgurskaya, H.I., and Nikaido, H. (1999). Bypassing the periplasm: Reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 7190–7195.
- Zhang, C., Sherman, M.P., Prince, L.S., Bader, D., Weitkamp, J.-H., Slaughter, J.C., and McElroy, S.J. (2012). Paneth cell ablation in the presence of *Klebsiella pneumoniae* induces necrotizing enterocolitis (NEC)-like injury in the small intestine of immature mice. *Disease Models & Mechanisms* 5, 522–532.
- Zhang, M., Zhang, J., Li, J., Wu, X., Xiao, L., Liu, X., Yang, X., Yang, L., Zou, Q., and Huang, W. (2020). AmpR Increases the Virulence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* by Regulating the Initial Step of Capsule Synthesis. *Infect Drug Resist* 13, 3431–3441.
- Zheng, Y., Yue, C., Zhang, H., Chen, H., Liu, Y., and Li, J. (2021). Deoxycholic Acid and Lithocholic Acid Alleviate Liver Injury and Inflammation in Mice with *Klebsiella pneumoniae*-Induced Liver Abscess and Bacteremia. *J. Inflamm. Res. Volume 14*, 777–789.
- Zhou, M., Ding, X., Ma, F., Xu, Y., Zhang, J., Zhu, G., and Lu, Y. (2019). Long polar fimbriae contribute to pathogenic *Escherichia coli* infection to host cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 103, 7317–7324.
- Zhou, P., Li, X., and Qi, F. (2015). Establishment of a counter-selectable markerless mutagenesis system in *Veillonella atypica*. *Journal of Microbiological Methods* 112, 70–72.
- Zhou, Y., Smith, D., Leong, B.J., Brännström, K., Almqvist, F., and Chapman, M.R. (2012). Promiscuous cross-seeding between bacterial amyloids promotes interspecies biofilms. *J Biol Chem* 287, 35092–35103.
- Zobell, C.E. (1943). The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *J Bacteriol* 46, 39–56.

---

# Annexes


---

## Annexe n°1



Review

## From *Klebsiella pneumoniae* Colonization to Dissemination: An Overview of Studies Implementing Murine Models

Laura Joseph <sup>†</sup>, Thomas Merciecca <sup>†</sup>, Christiane Forestier, Damien Balestrino <sup>\*,‡</sup>  and Sylvie Miquel <sup>‡</sup>

Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, Université Clermont Auvergne, CNRS, F-63000 Clermont-Ferrand, France; laura.joseph@uca.fr (L.J.); thomas.merciecca@uca.fr (T.M.); christiane.forestier@uca.fr (C.F.); sylvie.miquel@uca.fr (S.M.)

\* Correspondence: damien.balestrino@uca.fr

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>‡</sup> These authors contributed equally to this work.





Review

# From *K. pneumoniae* Colonization to Dissemination: An Overview of Studies Implementing Murine Models

Laura Joseph <sup>†</sup>, Thomas Merciecca <sup>†</sup>, Christiane Forestier, Damien Balestrino <sup>\*,†</sup>  and Sylvie Miquel <sup>‡</sup>

Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, Université Clermont Auvergne, CNRS, F-63000 Clermont-Ferrand, France; laura.joseph@uca.fr (L.J.); thomas.merciecca@uca.fr (T.M.); christiane.forestier@uca.fr (C.F.); sylvie.miquel@uca.fr (S.M.)

\* Correspondence: damien.balestrino@uca.fr

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>‡</sup> These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** *Klebsiella pneumoniae* is a Gram-negative pathogen responsible for community-acquired and nosocomial infections. The strains of this species belong to the opportunistic group, which is comprised of the multidrug-resistant strains, or the hypervirulent group, depending on their accessory genome, which determines bacterial pathogenicity and the host immune response. The aim of this survey is to present an overview of the murine models mimicking *K. pneumoniae* infectious processes (i.e., gastrointestinal colonization, urinary, pulmonary, and systemic infections), and the bacterial functions deployed to colonize and disseminate into the host. These in vivo approaches are pivotal to develop new therapeutics to limit *K. pneumoniae* infections via a modulation of the immune responses and/or microbiota.



**Citation:** Joseph, L.; Merciecca, T.; Forestier, C.; Balestrino, D.; Miquel, S. From *K. pneumoniae* Colonization to Dissemination: An Overview of Studies Implementing Murine Models. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1282. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061282>

Academic Editors: Aída Duarte and Cátia Caneiras

Received: 28 May 2021

Accepted: 9 June 2021

Published: 12 June 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*; in vivo murine models; colonization and virulence factors; new therapeutics

## 1. Introduction

*Klebsiella pneumoniae* is a Gram-negative non-motile and encapsulated bacterium found in environmental conditions as diverse as soil, plant leaves, mammalian intestines, and waste waters [1,2]. It is an opportunistic pathogen that is able to colonize the mucosal epithelium of the gut and nasopharynx and to disseminate into the deep tissues and bloodstreams of susceptible patients, causing severe infections such as pneumonia, meningitis, endophthalmitis, pyogenic liver abscesses, and bacteremia [3–6]. The ability of this bacterium to form a biofilm on invasive medical devices leads to subsequent health care associated infections, particularly in the urinary and pulmonary tracts [4]. *K. pneumoniae* infections are difficult to treat, particularly because of the pathogen's high endogenous antibiotic resistance. For example, *K. pneumoniae* is intrinsically resistant to ampicillin, owing to the presence of  $\beta$ -lactamase (SHV-1) encoding genes in its chromosomal genome [7]. In addition it was incriminated for the appearance of multidrug resistant (MDR) strains against third generation cephalosporins, fluoroquinolones, carbapenem and aminoglycosides [8,9]. The correlation between its wide ecological range and its ability to carry multidrug resistance genes makes of *K. pneumoniae* a good candidate for dissemination and horizontal gene transfer among the Gram-negative species. This pathogen contributes to a large diffusion of widespread antibiotic resistance genes especially in its diverse niches [9,10]. However, the severity of the infections engendered by *K. pneumoniae* is rarely linked to the antibiotic resistance profile of the incriminated strains but depends rather on the accessory genome that conditions bacterial pathogenicity. The association between the clinical phenotype and the genomic variations is hard to elucidate because of an intensive gene-content turnover between the strains, both in the core and accessory genomes [10].

Clinical strains of *K. pneumoniae* can be divided into two main categories: the classical group (cKp) comprising of MDR strains, and the hypervirulent (hvKp) group of strains [6]. cKp strains are usually hosted in the gastrointestinal (GI) tract of patients with intestinal portage, the incidences of which are estimated to be between 6 and 19% [9,11]. The molecular mechanisms leading to the emergence of *K. pneumoniae* infections in immunocompromised patients are unclear, but intestinal colonization is significantly associated with subsequent infections [12–14]. Indeed, whole genome sequencing of *K. pneumoniae* strains isolated from rectal swabs and clinical samples from the same patients showed that ~50% of *K. pneumoniae* infections result from the patients' own microbiota [11]. The impairment of microbiota colonization resistance gives rise to a bloom of *K. pneumoniae* cells within the intestinal tract and is thus likely to represent an early step in the progression of these infections [15]. HvKp strains are emerging variants of cKp that, unlike cKp strains, cause organ and life-threatening infections even in healthy immunocompetent individuals. hvKp strains are considered as strict pathogens that cause infections at multiple sites including pyogenic liver abscesses, pneumonia, endophthalmitis, meningitis, and necrotizing fasciitis followed by metastatic spreading [6,16]. The specific traits of hvKp were discussed in depth in a recent review published by Russo and Marr [17]. The understanding of the mechanisms of evolution from cKp to hvKp-specific virulence, however, is still incomplete. Hypervirulent strains mostly belong (around 70%) to K1 or K2 capsular serotypes [4,18–20]. HvKp strains always harbor one large plasmid, pLVPK (or highly similar pK2044), that is composed of many virulence genes such as *rmpA*, *mugA*, and *iro* and *iuc* operons, which are responsible for aerobactin synthesis [21,22]. Although most hvKp isolates are susceptible to antibiotics, the acquisition of extensive or pan-antimicrobial resistance has the potential to create the ultimate superbug, notably by the acquisition of the genes encoding for extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and carbapenemases [7,10,23,24].

Several in vitro studies have characterized the pathogenicity of *K. pneumoniae* strains and described the underlying molecular mechanisms and their immune evasion strategies [6]. The development of innovative in vitro models is promising, but the complexity of the host physiology (immunity, microbiota, and the dynamics of physico-chemical conditions) is often difficult to reproduce in a single in vitro model. These data often need to be complemented by in vivo experiments to obtain a high reality scale and a better understanding of host–pathogen interactions [25]. Although ethics statements applied to in vivo models impose strict controls and the limitation of their use, they are nevertheless indispensable to gain a fuller understanding of the infectious processes. Mammalian models are the most frequently used, owing to their reliability in mimicking human infections associated with *K. pneumoniae* [25]. The present review focuses on murine models (i.e., intestinal, pulmonary, urinary, and bacteremia) and their readouts to study the *K. pneumoniae* processes of colonization and infection, and the bacterial factors involved (Table 1). The potential therapeutic approaches to counteract the establishment or progression of the pathogen are also discussed.

Table 1. In vivo investigated readouts in classical *K. pneumoniae* and hypervirulent *K. pneumoniae*.

Model	Inoculation Mode	Read-Out	Technique	Strains		References	
				cKp <sup>a</sup>	hvKp <sup>b</sup>		
Gastrointestinal colonization	Intragastric	Colonization levels	CFU counting	☑	☑	[13,26–46]	
		Host status and immune response	Histopathology	☑		[27,40,41,47]	
			Cytokine quantification	☑		[35,40,47]	
			Inflammatory marker measurement	☑		[40–42,47,48]	
				FISH	☑		[26,28,41,42,47]
				Microscopy	☑		[41]
		Microbiota modification	16S DNA sequencing	☑		[13,26,35,39,41]	
		CFU counting	☑		[29,42]		
Systemic dissemination	Intragastric	Colonization levels	CFU counting		☑	[49–53]	
		Host status and immune response	Histopathology		☑	[49,51]	
			Cytokine quantification		☑	[49]	
			Microscopy		☑	[54]	
	Intravenous	Lethality	Survival		☑	[51,55]	
		Colonization levels	CFU counting	☑	☑	[16,56–58]	
			Host status and immune response	Histopathology		☑	[56,58]
			Cytokine quantification		☑	[56–58]	
			Microscopy		☑	[59]	
	Intraperitoneal	Lethality	Survival	☑	☑	[56,58–60]	
		Colonization levels	CFU counting	☑	☑	[53,55,61–66]	
			Host status and immune response	Histopathology	☑	☑	[62,66–68]
			Cytokine quantification	☑	☑	[63,64,66,69,70]	
		Inflammatory marker measurement	☑	☑	[65,66,70]		
		Microscopy	☑	☑	[61]		
Intraperitoneal	Microbiota modification	16S Sequencing	☑	☑	[66]		
	Lethality	Survival	☑	☑	[16,55,61–66,68–73]		
Subcutaneous	Colonization levels	CFU counting	☑	☑	[74,75]		
		Host status and immune response	Liver abscess measurement	☑	☑	[74]	
	Lethality	Survival	☑	☑	[72,75–77]		
Pulmonary infection	Intranasal	Colonization levels	CFU counting	☑	☑	[78–97]	
		Host status and immune response	Cytokine quantification	☑	☑	[79,83,84,86,89–92,95,98]	
			Histopathology	☑	☑	[78–82,86,91,92,95–97]	

Table 1. Cont.

Model	Inoculation Mode	Read-Out	Technique	Strains		References
				cKp <sup>a</sup>	hvKp <sup>b</sup>	
UTI <sup>c</sup>	Intratracheal		Inflammatory marker measurement	☑	☑	[79,82,84,86,88,92]
			Microscopy		☑	[92]
		Lethality	Survival	☑	☑	[78,81,85,86,93,95,98]
		Colonization levels	CFU counting	☑	☑	[75,99–118]
		Host status and immune response	Cytokine quantification	☑	☑	[100–103,108,115,116]
			Histopathology	☑	☑	[99–101,103–105,110,113,116,119,120]
			Inflammatory marker measurement	☑	☑	[100–103,109,114]
			Microscopy		☑	[105,113]
		Lethality	Survival	☑	☑	[75,77,100,101,111,112,115–120]
		Colonization levels	CFU counting	☑		[31,46,121–130]
Host status and immune response	Histology	☑		[127–129]		
	Microscopy	☑		[124,127,128]		
CAUTI <sup>d</sup>	Intraurethral	Colonization levels	CFU counting	☑		[131]

<sup>a</sup> cKp: Classical *K. pneumoniae*, <sup>b</sup> hvKp: Hypervirulent *K. pneumoniae*, <sup>c</sup> UTI: Urinary tract infection, <sup>d</sup> CAUTI: Catheter-associated urinary tract infection.

## 2. Intestinal Colonization

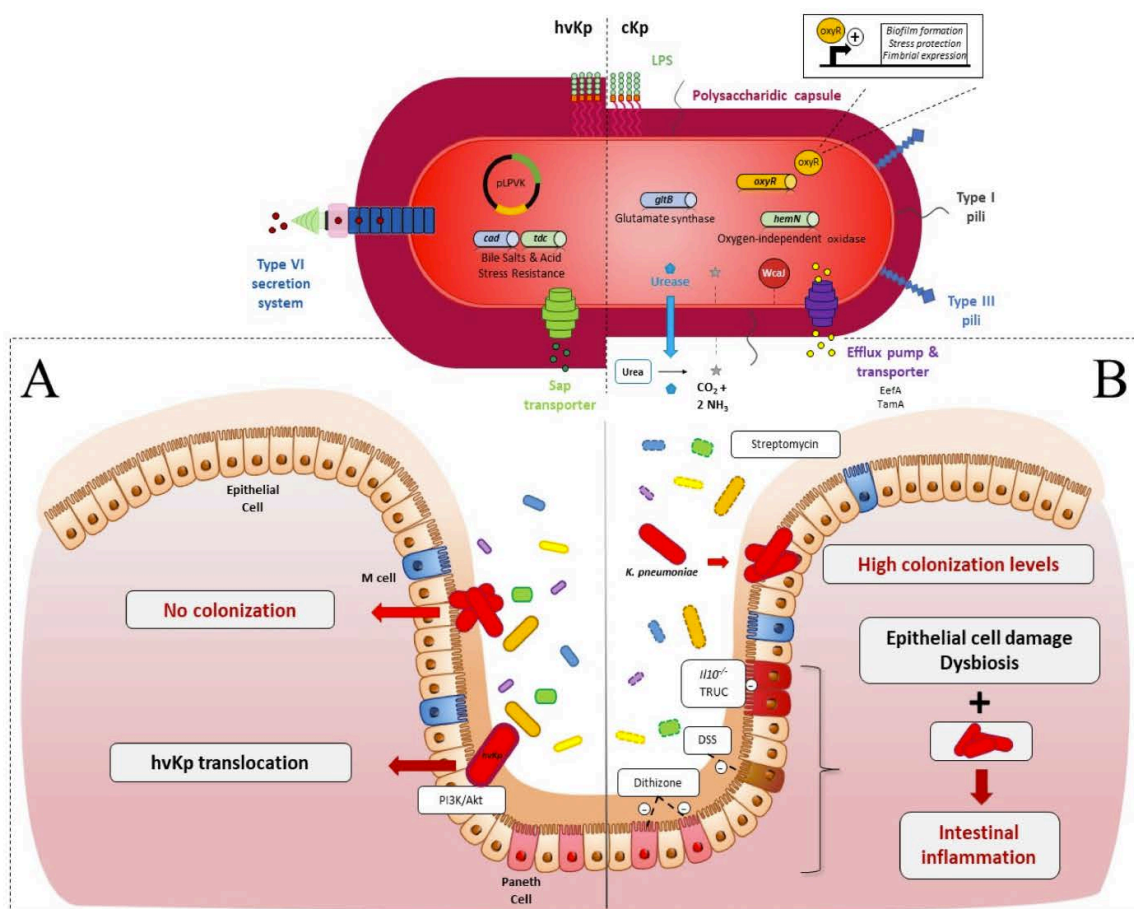
In humans, *K. pneumoniae* colonizes the intestinal microbiota and the establishment of this niche is considered as a starting point for dissemination and further infection [11,132]. Several murine models of intestinal colonization have thus been developed to study this pathophysiological process. Mice are an excellent tool to study *K. pneumoniae* gut colonization because they are easy to manipulate, the access to fecal content is easy, and they have a high reproductive rate. There is, however, no clear consensus concerning the genetic background of mice (OF1, BALB/c, CD1, CFW1, and C57BL/6), and no difference in the dynamics of *K. pneumoniae* colonization between the various backgrounds.

Routinely, the murine model of intestinal colonization consists of an oral route of inoculation (gavage, and less frequently pipette feeding or the administration of the pathogen in the drinking water) and the subsequent determination of the intestinal colonization by CFU counting in the intestinal or fecal contents, and an analysis of the immune host response (Table 1). Fecal shedding is currently used as a marker for gastrointestinal colonization by *K. pneumoniae* but an analysis of the different parts of the intestinal tract of mice that are orally contaminated showed an increasing gradient of colonization all along the intestine, with a preferential localization in the colon [26]. These approaches have highlighted the role of the local microbiota in *K. pneumoniae* implantation within the gut and characterized *Klebsiella* virulence and colonization factors.

### 2.1. Colonization Resistance of the Intestinal Microbiota to *K. pneumoniae*

Colonization resistance refers to the ability of the microbiota to prevent the expansion and persistence of exogenously acquired bacterial species [133]. Such a mechanism has been described in relation to the opportunistic pathogen *K. pneumoniae* (Figure 1A) [134]. Accordingly, the absence of intestinal microbiota in C57BL/6J germ-free (GF) mice resulted in higher levels of intestinal colonization by *K. pneumoniae* than those observed in con-

ventional mice, and the introduction of a normal microbiota into *K. pneumoniae*-colonized mice resulted in the reduction and clearance of *K. pneumoniae* [26,27]. The induction of microbiota dysbiosis, by antibiotics or chemical agents, is thus necessary to obtain efficient colonization by classical *K. pneumoniae* of the murine intestine, unlike the establishment of hvKp, which does not require microbiota disruption (Figure 1) [28,29,49].



**Figure 1.** *K. pneumoniae* in the gastrointestinal (GI) tract in an in vivo murine model (A) In healthy immunocompetent mice: (i) cKp (red oval, fine capsule) is not able to colonize the intestinal epithelium due to the presence of upright endogenous microbiota (yellow, blue, green and purple ovals, full line); (ii) hvKp (red oval, hypermucous) deploys many virulence factors. Type VI Secretion System (T6SS): to counteract the microbiota barrier; transporters of antimicrobial peptides and amino-acids (Sap, Tdc) and enzymes with lysine decarboxylase activity (Cad). Hypercapsular phenotype due to the presence of pLVPK plasmid (black circle) protects the pathogen against the host immune reaction. HvKp use the PI3k/Akt pathway to cross the epithelial barrier. (B) In intestinal dysbiotic mice: Dysbiosis (yellow, blue, green and purple ovals, dotted line) chemically induced (streptomycin, Dextran Sodium Sulfate (DSS), dithizone) or endogenous to immune-deficient murine models (*Il10<sup>-/-</sup>*, *T-bet<sup>-/-</sup>* *Rag2<sup>-/-</sup>* ulcerative colitis (TRUC)) allows the implantation of cKp. Gut colonization by *K. pneumoniae* associated with intestinal epithelium damage and dysbiosis enhanced the inflammatory state. Essential cKp colonization factors are related to capsule synthesis (WcaJ, red circle), metabolism advantage (urease, oxidase, and glutamate synthase) (blue diamond, blue and green cylinder), GI stress resistance (EefA, TamA, OxyR,) (purple, yellow cylinder) and surface cell adhesion (Type 1 and 3 pili).

Oral administration of streptomycin, an antibiotic that targets commensal facultative anaerobes, is the gold standard to establish cKp intestinal colonization, with bacterial inocu-

lums varying from  $10^5$  to  $10^8$  CFU [13,28,30–34,48,121,122]. Miller and Bonhoff observed that no *Bacteroides* were present in the feces of streptomycin-treated mice [135]. Accordingly, the ability of gnotobiotic mice to resist gut colonization by *K. pneumoniae* has recently been reported to be due to the presence of the Bacteroidetes phylum [35]. Thus, *Bacteroides* disruption by highly-concentrated streptomycin treatment led to a “supershedder phenotype” with high levels of fecal colonization ( $10^8$  CFU/g feces) by the *K. pneumoniae* strain KPPR1S [67]. Constant streptomycin pressure is therefore necessary to maintain a stable and high colonization of cKp, from  $10^8$  to  $10^{10}$  CFU/g feces. Lagrèfeuille et al. showed that the colonization level of cKp decreased by 3 log units in one week if streptomycin was given at only one time point 48 h before inoculation [36]. However, although *K. pneumoniae* becomes undetectable in the feces after the initial colonization, it seems to persist at low levels in microniches in the colonic environment. Indeed, 15 days after CFU counts fell below the detection limit, the administration of ampicillin induced a rise above the detection limit of *K. pneumoniae* CFU in mice feces [37].

In 2003, Høyen et al. analysed the effect of the administration of different antibiotics on the gut colonization abilities of ESBL-producing *K. pneumoniae* in a murine model [38]. The mice were intraperitoneally treated with either antibiotics targeting anaerobes such as clindamycin, piperacillin/tazobactam, ceftriaxone, and ceftazidime, or antibiotics with a low effect on anaerobes such as cefepime, levofloxacin, and aztreonam, and then orally inoculated with the SHV ESBL-producing P62 strain ( $10^3$  CFU at day 0 and then  $10^8$  CFU at day 5).

Antibiotics with low effects on anaerobes did not influence *K. pneumoniae* intestinal colonization levels, whereas treatment with anaerobe-targeting antibiotics resulted in greater colonization levels (from  $10^5$  to  $10^7$  CFU/g feces) than treatment with a saline buffer. Only clindamycin promoted stable and rapid colonization of up to  $10^9$  CFU/g feces at 3 days post-inoculation [38]. In line with these results, Perez et al. showed that the inhibition of anaerobes, especially the *Bacteroides* species, by daily subcutaneous treatment with clindamycin allows maximal *K. pneumoniae* gut colonization levels (up to  $10^{10}$  CFU/g feces) [29]. More recently, the correlation between microbiota composition and *K. pneumoniae* gut colonization was assessed by a deep sequencing approach. Treatment with fidaxomicin, a molecule with a narrow-antimicrobial spectrum, poorly modulated the microbiota composition and achieved only low intestinal colonization ( $<10^4$  CFU/g feces) by *K. pneumoniae*. In contrast, the administration of vancomycin, which inhibits *Firmicutes*, resulted in a greater level of colonization ( $10^6$  to  $10^{10}$  CFU/g of stool) [39].

Dysbiosis, which is required to impair colonization resistance, can also be induced by other chemical treatments (Figure 1B). For instance, the induction of intestinal dysbiosis by the oral administration of 3% w/v Dextran Sodium Sulfate (DSS) results in a 3-log increase in the *K. pneumoniae* colonization level in feces of mice 3 days post-inoculation [27]. This high colonization level is however not linked to DSS-induced intestinal inflammation, since no increase in the colonization by *K. pneumoniae* was observed in a *Citrobacter rodentium* model that generates inflammation but not dysbiosis [27].

The immune status of the host determines the pro-inflammatory levels of intestinal tissue in response to *K. pneumoniae* colonization. However, the precise role of each protagonist (host immune response, endogenous microbiota, and *K. pneumoniae*) is hard to decipher owing to the complexity and diversity of the animal models used in the different studies (Figure 1B). Genetically modified mice models have been used to go further in the investigation of the host pathophysiology during intestinal colonization by *K. pneumoniae*. For instance, in *Il10<sup>-/-</sup>* mice with a low grade of intestinal inflammation, *K. pneumoniae* infant isolates potentiated inflammation and elicited colitis since fecal lipocalin-2 levels increased 1-month post-infection [40]. Similarly, oral administration of salivary *K. pneumoniae* isolates potently induced colonic T<sub>H</sub>1 cells in the same model [41]. The colitogenic properties of *K. pneumoniae* are also linked to the endogenous microbiota. The pro-inflammatory effects of *K. pneumoniae* were higher in mono-associated or naturally colonized mice than in mice colonized with a full complement microbiota [40]. In addition, the *K. pneumoniae* strains

recovered from the feces of colitis-susceptible animals, *T-bet*<sup>-/-</sup> *Rag2*<sup>-/-</sup> ulcerative colitis (TRUC), were able to induce colitis in wild-type mice after oral administration, but only in the presence of endogenous microbiota [42]. These observations provide evidence that commensal microbiota work in concert with *K. pneumoniae* and other intestinal pathobionts to cause intestinal inflammation.

The role of *K. pneumoniae* in the exacerbation of intestinal inflammation has also been reported in mice with intestinal microbiota disruption due to chemically induced colitis. The administration of *K. pneumoniae* to new-born mice treated with dithizone, a molecule that induces Paneth cell ablation associated with microbiota dysbiosis, exacerbates intestinal inflammation, which leads to a necrotizing enterocolitis-like pathology [47,48]. The presence of colitogenic agents such as *K. pneumoniae* in gut microbial communities is thus necessary but not always sufficient to elicit intestinal inflammation in susceptible mice colitis models (either genetic or chemically induced). The intrinsic capacities of the strains also seem to be important, but the specific associated inflammatory factors remain to be identified.

## 2.2. *K. pneumoniae* Colonization Factors

The implantation of cKp strains in the gut and their persistent colonization involve competition with commensal bacteria and a variety of stressors for survival, including the limitation of resources. Bacterial fitness in this complex environment is mediated by a multitude of pathogen-associated factors, usually referred to as colonization factors, that enable the dense growth and persistence of the bacteria in the intestinal lumen.

Intestinal colonization models combined with the screening of *K. pneumoniae* transposon insertional mutant libraries (signature-tagged mutagenesis [STM] and multi-screening STM [MS-STM]), are powerful approaches that are able to identify the genetic factors involved in gut colonization. The mutants impaired in the intestinal colonization were mainly affected in metabolic pathways, membrane transporter synthesis, DNA-metabolism, transcriptional regulation, and unknown functions, and in lipopolysaccharides (LPS), phospholipids and fatty acid biosynthesis [43,122]. More recently, *K. pneumoniae* genes crucial for dense gut colonization were identified by the screening of a highly saturated transposon mutant library (<150,000 unique mutations) in antibiotic-treated mice orally inoculated with ~10<sup>8</sup> CFU of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (10<sup>2</sup> to 10<sup>3</sup> CFU of each transposon mutant per inoculum). The bacterial content of the fecal samples longitudinally collected for 4 weeks were sequenced by genome-wide transposon insertion sequencing (INseq) [13]. This approach identified the genes that promote short- and long-term high-density colonization of the intestinal tract, including genes encoding for inner/outer membrane proteins, proteins involved in carbohydrate metabolism, DNA repair/metabolism, glutamate metabolism, and porphyrin metabolism. Some mutants with enhanced fitness were also identified with this methodological approach [13]. The creation of isogenic mutants and their testing in individual or competitive assays have confirmed the importance of the genes previously identified. For instance, Jung et al. confirmed dramatic defects related to gut colonization for *ΔtamA* (transport system), *ΔgltB* (glutamate synthase) and *ΔhemN* (oxygen-independent oxidase) mutants in a 1:1 competition assay with the wild-type *K. pneumoniae* strain, whereas the *ΔfulA* (formate hydrogenlyase transcriptional activator) mutant colonized the animal gut better than the wild-type [13]. The screening of mutant libraries in colonization models emphasizes the importance of the diversity of the bacterial functions that play prominent roles in bacterial establishment inside the gut. In particular, several metabolic functions are primordial for bacterial colonization since they confer advantages to outcompete resident microorganisms with a similar metabolism (Figure 1).

To validate the role of a bacterial function in intestinal colonization, the classical approach is to test the isogenic mutant of the encoding-gene in a colonization model, either individually or in competition with the wild-type parental strain. The phenotype of the mutants will then strongly depend on the experimental model, i.e., individual or competition testing. Mutants deficient in a factor required for competition in an ecological

niche could be deficient when tested in a competitive assay but could be unaffected when tested individually. For instance, a cKp mutant defective in urease production ( $\Delta ureA$ ) showed no colonization defect when tested individually but was impaired in its colonization capacities when tested in competition with the wild-type strain [30]. However, authors rarely test the mutants in both models in their experimental methodology. Hsieh et al. showed that the *cad* and *tdc* operons, which confer adaptation of the hvKp NTUH-K2044 strain to bile salts and acidity, respectively, were involved in efficient intestinal colonization when the mutants were tested in competition with the virulent wild-type strain. However, the phenotype of the mutants was not evaluated in an individual colonization assay [34]. Similarly, the tripartite efflux pump EefABC conferred a competitive advantage on cKp for intestinal colonization, but its role was not analysed in an individual colonization assay. Growth experiments in the presence of different stresses showed that this efflux system confers acid tolerance on bacteria in response to an inorganic acid (e.g., chlorhydric acid), a condition encountered inside the intestinal tract [33].

Some other colonization factors contribute not only to competition with microbiota, but also to bacterial establishment and multiplication in the intestine (Figure 1). Thus, mutants deficient in these functions are deficient in both individual and competitive assays. For instance, the role of capsular polysaccharides (CPS) in intestinal colonization was described in both individual and competitive assays by Young et al. [67]. The capsule-deficient mutants  $\Delta manC$  and  $\Delta wcaJ$  colonized poorly over the course of 15 days in individual colonization assays, and the  $\Delta manC$  mutant presented a negative competitive index ( $\Delta manC/WT$ ) in co-infection with the wild-type strain [67]. The role of the *K. pneumoniae* capsule in establishing robust gastrointestinal colonization was also observed by Favre-Bonté et al. in both individual and competitive assays with the wild-type strain [28]. In their study, a cKp capsule-deficient mutant colonized at lower levels ( $10^4$  CFU/g feces) than the wild-type strain, which persisted in the intestinal tract at high levels ( $10^8$  CFU/g feces), and in situ hybridization with fluorescence-labelled oligonucleotide probes on the colonic section in mice showed that the mutant formed clusters in the mucus layers, whereas the wild-type strain remained dispersed [28]. The role of certain fimbriae that are assembled by the chaperone-usheer (CU) pathway has also been assessed in both individual and competition models. An in silico predictive approach identified two novel CU systems encoded by *kpj* and *kpg* loci in cKp LM21. The deletion of the usheer-encoding gene in these two operons significantly impaired intestinal tract colonization in a co-colonization assay with the wild-type strain. However, only the mutant deficient in the usheer of the putative Kpj structure was tested in individual colonization assays, in which it also presented a colonization defect [32]. In a more recent study using INSeq, the deletion of *kpjC*, which encodes the usheer protein in the *kpj* operon, did not however significantly alter the intestinal colonization of the *K. pneumoniae* carbapenem-resistant (CR-Kp) ST258 strain in a competitive assay [13]. The role of type 1 and type 3 pili have been mainly studied in murine intestinal competition assays by co-infecting a deficient mutant and the wild-type parental strain. Although the role of type 3 pili in efficient colonization is well established, studies are at a variance concerning the role of type 1 pili [13,31,32,44].

Bacteria can form multicellular biofilm-like communities in the gastrointestinal tract and therefore co-infection with a wild-type strain and a mutant deficient in individual colonization assays could form a mixed population (intraspecies) in the intestine, which would help compensate for the deficiency of the mutant strain. However, to our knowledge, no study has described this phenomenon. Several bacterial factors have been identified in individual colonization assays but their role in a competitive context has not been assessed. For instance, a *K. pneumoniae oxyR* mutant was drastically affected in an individual murine intestinal colonization assay after orogastric inoculation but its phenotype was not determined in a competitive assay [45]. The transcriptional factor OxyR, a member of the LysR regulator family, is commonly associated with the detection of elevated levels of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide and the subsequent regulation of the expression of antioxidant genes that protect the bacterial cells from being killed.



OxyR is also involved in the regulation of several phenotypes classically associated with the process of gastrointestinal colonization, such as biofilm formation, fimbrial synthesis, motility, and resistance to intestinal stresses [136–138].

The use of animal models allows for a better understanding of the molecular mechanisms involved during gastrointestinal tract colonization by *K. pneumoniae*. The behavior of *Klebsiella* inside the intestine flora and its interactions with the other members of the microbiota are poorly documented however, and further elucidation would require the development of gnotobiotic models with controlled microbiota. Finally, although it is assumed that the intestinal colonization precedes the infection of secondary sites, the precise pathophysiology of *Klebsiella* infections is still unclear.

### 3. Systemic Infections

Extraintestinal infections involving bacteria from the intestinal microbiota result from both exogenous and endogenous contamination. Unlike cKp, hvKp strains are able to disseminate in immunocompetent patients, which increases the risk of community-acquired infections. Different murine models have been developed to assess the pathophysiology of extra-intestinal infections and their associated mortality (Table 1). Oral inoculation of the pathogen, by mimicking the natural route of *K. pneumoniae* infection, makes it possible to study the phenomenon of bacterial translocation. However, extra-intestinal inoculations (i.e., subcutaneous, intraperitoneal, or intravenous) are usually performed to assess systemic bacterial fitness. While no clear consensus has been established regarding the genetic background of the mice used in experimental models (e.g., BALB/c, C57Bl/6, ICR, Swiss Webster), the BALB/c line is most often used [49,59,61,74]. Genetically impaired models are also used to investigate the behavior of hvKp strains in immunocompromised mice.

#### 3.1. Spreading from the Intestinal Tract

Orogastric inoculation of the pathogen is a useful way to investigate the spatial and temporal kinetics of hvKp *K. pneumoniae* infection such as the ability of the bacteria to cross the epithelial barrier (Figure 1A) and to induce extraintestinal infections, particularly in the blood, spleen, and liver. Although intestinal translocation is not clearly established for cKp strains, oral gavages of BALB/c mice with  $10^7$  CFU of hvKp CG43 induced, as early as 24 h post-inoculation, colonization of the spleen with 3 to 4 log CFU/g, and subsequent dissemination to the liver, blood, and kidneys at 36 h, 48 h, and 72 h post-inoculation, respectively [49]. Four stages of hvKp strain infection have thus been determined: (i) intestinal colonization rapidly followed by (ii) extraintestinal dissemination, (iii) hepatic replication and, (iv) sepsis [49]. Each of these infection steps is governed by specific bacterial factors, especially those encoded by the virulence plasmid of hvKp strains since the hvKp CG43 pLVPK-cured strain is attenuated in the dissemination from the gastrointestinal tract to systemic circulation and to extraintestinal organs compared to the parental wild-type strain [50].

After oral inoculation of the CG43 hvKp strain ( $10^7$  CFU) in C57BL/6 mice, 28 STM mutants (impaired in cell metabolism, surface components and transporters, and regulation functions) that attenuated liver and spleen dissemination were identified. Of these, eight avirulent mutants specifically affected in the epithelial barrier translocation were identified; they did not cause mouse mortality, but their virulence was restored when inoculated intraperitoneally [49]. The factors essential for the translocation process are associated with type III fimbriae assembly, uracil permease synthesis, and quorum-sensing. The molecular mechanisms of intestinal barrier translocation remain incompletely defined but could involve the PI3K/Akt dependent pathway [54]. The same group identified the Sap complex as being involved in the dissemination process from the intestine after oral inoculation of hvKp Ca0437. The Sap transporter, an inner membrane complex conferring resistance on antimicrobial peptides in *Salmonella*, is associated with extraintestinal bacterial dissemination to the spleen and liver. A  $\Delta sapA$  mutant had a three-fold reduced bacterial load in the liver and spleen 72 h after oral inoculation compared to the Ca0437 wild-type

strain. This attenuated phenotype was shown to be associated with a lower histological pathology score in the liver and colon of *ΔsapA*-inoculated mice than in those inoculated with the wild-type strain [51]. The type VI secretion system (T6SS), a molecular syringe with bactericidal activity harbored by certain pathogens, is also involved in hvKp virulence since it allows microbiota-encountered resistance during the colonization process to be bypassed [139]. Hsieh et al. identified a T6SS in the hypervirulent NTUH-K2044 strain that is critical for successful intestinal colonization and extraintestinal dissemination. In mice inoculated with both the wild-type NTUH-K2044 strain and its T6SS deletion mutant (ratio 1:1), the mutant was detected at much lower levels than the wild-type strain in the intestine, liver, and spleen (competitive index of 0.123, 0.197, and 0.118, respectively) 7 days post-inoculation [52]. Intra-gastric inoculation can reproduce the first steps of the natural *K. pneumoniae* infectious route, but it does not allow the identification of the factors specifically involved in extraintestinal dissemination.

### 3.2. Spreading from Extraintestinal Sites

The systemic inoculation of hvKp in mice is performed intravenously, subcutaneously, or intraperitoneally in order to bypass the gastrointestinal barrier. Such approaches have allowed the identification of specific hvKp-associated virulence factors in in vivo murine models.

As an essential component, the pLVPK plasmid, which carries inter alia, the *rmpA* and *magA* virulence genes, is largely responsible for the hypervirulent phenotype in hvKp. The presence of *rmpA* (a regulator of the mucoid phenotype) and *magA* (mucoviscosity-associated gene A) genes on the pLVPK plasmid confers on hvKp a hypermucous phenotype [68,140]. The loss of RmpA and/or RmpA2 is associated with decreased capsule production, potentially making RmpA/RmpA2 the critical factors for the increased virulence of hvKp strains compared to cKp strains [17]. However, whereas prevalence studies showed an association of *rmpA* with infection severity in mice, its role in *K. pneumoniae* virulence remains unclear. The deletion of the plasmid-born *rmpA* gene in the hvKp NTUH-K2044 strain does not significantly reduce the virulence of *K. pneumoniae* in mice, either in mice survival assays or in in vivo competition assays after intraperitoneal inoculation [55]. MagA (renamed Wzy<sub>KpK1</sub>) is a capsular polysaccharide polymerase specific to serotype K1 [68,71]. *ΔmagA* mutants lose their mucoviscosity, become susceptible to neutrophil phagocytosis, and are not lethal to mice [68,71]. Likewise, an uncapsulated *ΔwcaJ* mutant deficient in the WcaJ glycosyltransferase involved in the initial steps of capsule production is impaired in its ability to disseminate into the liver, lungs, and spleen of intraperitoneally infected mice in comparison to the parental strain [53]. After intraperitoneal inoculation in mice, the serine protease *hrtA* mutant in a hvKp strain, abrogated in capsule production, had a 500-fold greater LD<sub>50</sub> than the WT strain, thereby evidencing the primordial role of the capsule of *K. pneumoniae* in the infection process [141].

In vivo models have also been used to investigate the role of capsular polysaccharide composition in virulence. Pan et al. showed that intravenous inoculation of a KpL1 hvKp mutant deficient in *gmd*, a gene responsible for fucose synthesis, induces a mortality rate among mice of only 5% within 14 days compared to full mortality with the wild-type strain [60]. One explanation would be that the fucose-rich capsular serotype of virulent strains has less affinity for murine macrophages than the avirulent capsular-serotype strain [16]. Fucose-poor and mannose-rich capsules of classical KpU1 strains are highly adherent to mouse-isolated peritoneal macrophages in contrast to fucose-rich and mannose-poor capsules of hvKp KpL1 strains, suggesting that a fucose-containing capsule has the advantage of bypassing the host defences [59]. Additionally, a KpL1 *gmd* mutant had a greater adherence to pre-recruited mouse peritoneal macrophages than its parental strain and was unable to disseminate via systemic circulation [60]. The large amount of mannose in cKp capsules would thus explain the tropism for phagocytes and the greater clearance of cKp from the host compared to hvKp. In accordance, the strains of *K. pneumoniae* expressing Man- $\alpha$ 2/3-Man or Rha- $\alpha$ 2/3-Rha sequences in their capsule could be effectively recognized

by macrophage mannose receptors and ingested by macrophages, although hvKp K1 and K2 serotype strains that lack Man- $\alpha$ 2/3-Man or Rha- $\alpha$ 2/3-Rha in their capsule would thus not be recognized by the macrophage lectins [142,143]. In hvKp strains, capsular polysaccharides are thus essential virulence factors since they avoid, by their composition, recognition by macrophages. Thus, intraperitoneal injections in BALB/c mice showed that K1 and K2 capsular serotype strains were highly virulent, whereas the uncapsulated  $\Delta$ K1 mutant ( $\Delta$ *rfbP*) had substantially attenuated virulence similar to that of the cKp K62 strain. Serotypes K1 and K2 had greater phagocytic resistance to neutrophils than the K62 and the  $\Delta$ K1 mutants, and the determination of CFU in organs showed that mice lethality is linked to the inability to clear bacteria [62]. Time-dependent increases in cytokines and chemokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, KC, and MIP-2) in the serum and liver were observed only in hvKp K1- and K2-infected mice in contrast to the inoculations of K62 and  $\Delta$ K1, which did not result in similar strong immune responses [62].

Other surface structures, such as lipopolysaccharides, play a role in the expression of hvKp virulence in vivo. For instance, in a mouse intraperitoneal infection model, hvKp *wbbO* mutants (NTUH-K2044 and NTUH-A4528 backgrounds) impaired in a galactosyltransferase that is required for serotype O1 were poor colonizers of mouse organs (i.e., liver, spleen, and blood) and induced a lower lethality rate than the wild-type strain [63]. Membrane lipoproteins Pal, LppA and YfgL are also involved in the virulence, dissemination, and induction of inflammation: mice intraperitoneally infected with deficient mutants had a better viability, as measured by the determination of the LD<sub>50</sub> or 28-day survival rate, had a lower bacterial dissemination and a lower IL-6 production in the liver and spleen than the mice infected with the parental wild-type strain [64,69].

The production of siderophores also confers on *K. pneumoniae* a selective advantage for virulence in in vivo systemic infection models. A quantitative analysis of siderophores has demonstrated that hvKP strains produce more siderophores than cKp strains and that this trait enhances hvKP virulence, since a high siderophore concentration was strongly predictive of a hvKp isolate and an increased lethality in a mouse systemic infection model [76]. HvKp strains have the ability to produce four different siderophores: enterobactin (Ent), yersiniabactin (Ybt), salmochelin (Sal), and aerobactin (Aer), but only Sal and Aer are specific to hvKp. The *iro* and *iuc* operons, responsible for Aer synthesis, are carried by the virulent pLVPK plasmid in the hvKp strains [22]. Aerobactin accounts for the overwhelming majority of increased siderophore production in hvKp, independent of the gene copy number. The role of each siderophore in virulence has been evaluated in pulmonary, subcutaneous, and intraperitoneal infection models by measuring the mortality of outbred CD1 mice after subcutaneous challenge with hvKP1 mutants deficient for one or more siderophores. Of all the mutants tested, only the hvKP1 isogenic Aer ( $\Delta$ *iucA*) mutant showed attenuated virulence in all models [72,77]. The role of aerobactin in virulence is however lower than that of the capsular polysaccharides. K1 and K2 strains were highly virulent in BALB/c mice after intraperitoneal injections, whereas the uncapsulated  $\Delta$ K1 mutant ( $\Delta$ *rfbP*), while still harboring the Aer encoding gene, had a substantially attenuated virulence, similar to that of the cKp K62 strain [62]. Fulfilling Koch's postulate, the combined effects of the overproduction of the virulence factors and a high degree of phagocytosis resistance seem to be very useful in the dissemination of hvKp. The interactions with host immunity are largely related to capsule polysaccharides and to the virulence of the strains (e.g. cKp or hvKp) which is dependant of the bacterial accessory genome [6,62].

By mimicking host pathology-engendered susceptibility, immunocompromised in vivo models greatly contribute to the understanding of the pathophysiology of *K. pneumoniae* systemic infections. hvKp strains cause skin and tissue infections in immunocompromised patients which can be reproduced in neutropenic mice treated with an anti-Ly6G antibody [19,74]. Interestingly, in this model some CR-Kp strains are as virulent as a hvKP strain in their ability to form subcutaneous abscesses and to disseminate to the liver. Intravenous infection of immunocompromised diabetic mice with the low virulent cKp (KpU1 UTI strain) results in more severe lethality than in non-diabetic mice. Similarly, a hvKP

strain isolated from the liver abscess had a greater virulence in diabetic than in nondiabetic mice [56]. In the same study, intravenous infection with hvKp significantly decreased the blood TNF- $\alpha$  level in diabetes mellitus mice, whereas the IL-1 $\beta$  level tended to increase in the blood of both infected nondiabetic and diabetic groups [56]. Another study using diabetic mice treated with streptozotocin, which ensures the death of pancreatic  $\beta$ -cells, evidenced the ability of cKp and hvKp to translocate into the liver via Kupffer cell activation. In this model, diabetes mellitus caused enteric dysbiosis, which leads to the production of nitric oxide and the subsequent stimulation of Kupffer cells [57]. Interestingly, IFN- $\gamma$  KO mice intravenously infected with the hvKp 43,816 strain were no more susceptible than their wild-type counterparts. The overproduction of the liver cytokine IL-10 in IFN- $\gamma$  KO mice 2 days post-infection compared to the production in wild-type mice (35 ng/mL vs. below detection limit, respectively) could explain the underlying response [58]. However, other studies showed that the inhibition of IL-10 activity using the anti-IL-10 antibody tends to enhance the survival of mice after intraperitoneal or intratracheal inoculations of *K. pneumoniae* [144,145]. The role of the IL-10 cytokine can vary significantly depending on the site of infection [58].

Systemic infection models can be used to investigate the dissemination of the pathogen and its colonization of extraintestinal organs while avoiding the epithelial barrier translocation process. Since the prevalence of cKp strains in severe disseminated infections is low, most studies use K1 or K2 hvKp strains with high infectious doses. However, cKp strains can cause community-acquired infections in susceptible hosts with comorbidities who are immunocompromised or who have an existing barrier breakdown. Thus, the development of animal models mimicking susceptible hosts will be a significant contribution to understanding the pathophysiology of these infections.

#### 4. Pulmonary Infections

*K. pneumoniae* has been historically recognized as a common respiratory pathogen since its discovery in 1882 and is involved in both community-acquired pneumonia (CAP) and hospital-acquired pneumonia (HAP) [4,146]. CAPs caused by *K. pneumoniae* are rare in Europe and North America but account for 15% of the total cases of CAP in Asia and South Africa, mainly due to the increasing prevalence of hvKp strains [146–150]. Medical ventilators are a major risk factor in HAPs caused by *K. pneumoniae* because they provide the pathogen with a surface on which to colonize and form biofilms [149,151].

##### 4.1. In Vivo Models

To assess host–pathogen interactions during *K. pneumoniae* pulmonary infections, several in vivo models have been developed including non-mammalian models [25] (Table 1). However, murine models are the most widely used because they are easy to handle and because there is a significant similarity in the infectious process of murine and human pneumonia [152]. The first model was developed in 1947 and consisted of an intratracheal inoculation of bacteria in rats to evaluate antibiotic treatments [119,120]. Since then, several models of pneumonia have been used that are mostly based on two methods of inoculation.

The first method involves the direct instillation of bacteria into the lower respiratory tract. It requires general anesthesia, either by endotracheal injection or oropharyngeal inoculation. For endotracheal injection, the trachea is exposed by surgery and a volume of 10 to 50  $\mu$ L of bacterial suspension is injected before the closure of the incision [99–104]. This method can lead to the inflammation of the area, especially of the surgical wound, that potentially affects the global immune response measured at the endpoint of the experiment. For oropharyngeal inoculation, animals are placed in a semi-vertical position and a volume of 10 to 50  $\mu$ L is injected with a blunt-tipped needle either at the tracheal entrance or directly into the bronchi [77,105–109,119,120]. These techniques allow the administration of a precise bacterial inoculum into the lungs, which results in a good reproducibility of the infection [152,153]. Both methods are tricky and can cause the unilateral infection of the left lung and consequently a disparity in the effects of the infection on animals [99].

The second popular method used to induce pneumonia involves the inoculation of bacteria in the upper respiratory tract by intranasal instillation. The animals are held in a semi-vertical position, after brief anesthesia, and droplets of the bacterial inoculum are deposited onto the nares, allowing the contamination of the lungs by aspiration during breathing. The volume of the inoculum is generally around 20  $\mu\text{L}$ , administered sequentially by aliquots of 5 to 10  $\mu\text{L}$  [78–84]. Intranasal instillation is less invasive than instillation in the lower respiratory tract but the dose of bacteria that reaches the lungs is difficult to control [152]. The inoculum can (i) be expelled from the nares during expiration, (ii) be diverted to the alimentary tract or (iii) stay in the upper respiratory tract, leading to a high variability of infection.

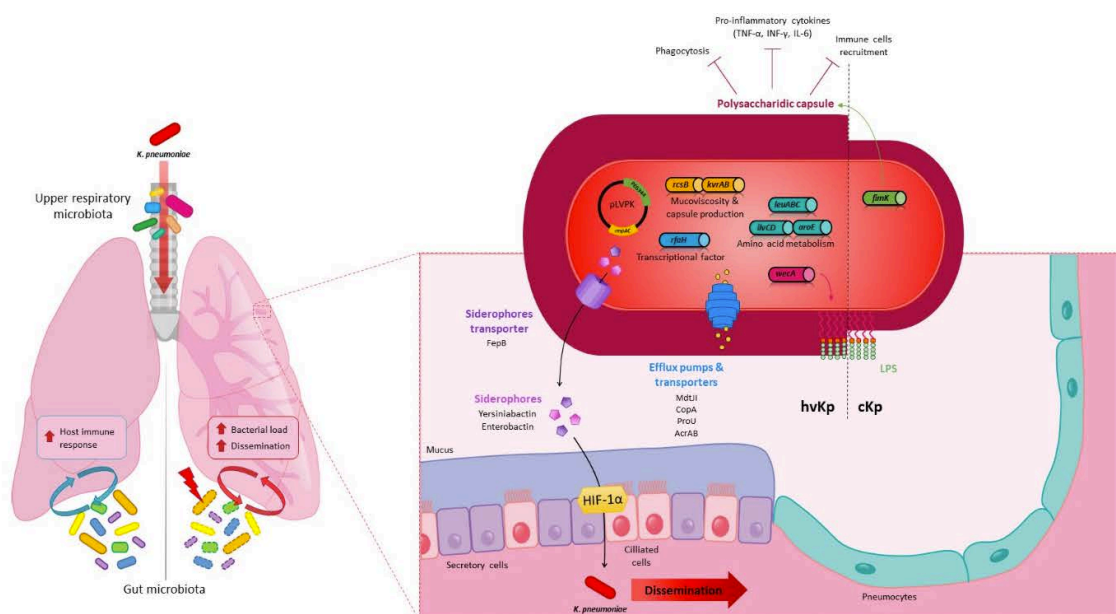
There is no consensus on the bacterial inoculum load in the overall experiments performed with murine pulmonary models. However, it should be noted that inoculation in the lower respiratory tract requires a lower dose than intranasal inoculation. Bacterial inoculum varies from  $10^3$  to  $10^9$  CFU, depending on the virulence of the strain (hvKp or cKp) and the susceptibility of the mice [81,85,102,108]. Although there is no consensus on the background of the mice used to mimic the pulmonary infection, C57BL/6 mice are the most commonly chosen. However, studies related to the host physiology are more likely to use BALB/c, 129, CBA, or C3H backgrounds. In addition, genetically modified mice whose production of immunological markers is impaired are often used to characterize the host responses to bacterial pulmonary infection.

The classical method to evaluate the role of bacterial factors in the establishment of pneumonia and the impact of host immunity or treatments on the disease outcome is to determine the bacterial burden in the lungs and other tissues by standard quantitative culture. The determination of the bacterial load is sometimes supplemented by other approaches such as survival rate, histological studies of lung tissues, or host immune response analysis in the tissues and the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) (Table 1). Another alternative, which is highly sensitive and non-invasive, is the quantification of the bioluminescence emitted by a pathogen genetically modified to express the bioluminescence-encoding genes (*lux* operon). This technique, infrequently used with *K. pneumoniae* lung infection models, is a useful tool to monitor the bacterial burden and to analyse the kinetics of spreading, and in parallel, to contribute to reducing animal numbers in accordance with ethical regulations.

#### 4.2. *K. pneumoniae* Pulmonary Virulence Factors

Lung infection models in mice were used to characterise *K. pneumoniae* virulence factors (Figure 2) and tropism without any rationale concerning the choice of the inoculation methods which seemed to depend mainly on routine laboratory practices. The polysaccharide capsule was one of the first and most described virulence factors in in vivo pneumonia models and is essential to establish pulmonary infection despite local immune pressure [86,99,105,110]. The deletion of the capsule in *K. pneumoniae* impairs its growth and survival in the lungs and aborts its ability to cause severe pulmonary infection and animal death in both intranasal and intrapulmonary in vivo models [78,86,105,110]. In addition to protecting against phagocytosis, the capsule reduces the host inflammatory response by shielding the LPS O-antigen from innate immunity recognition, thus limiting immune cell recruitment in BALF and the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-6) in the early and late stages of infection in the intranasal model [79,86,98]. Capsule production is transcriptionally regulated by a number of proteins that are associated with bacterial virulence in the lungs [4]. For instance, a mutant deficient in FimK, a pilus regulator involved in capsule production, produces significantly less capsule than the wild-type strain and is attenuated in virulence in murine intrapulmonary models compared to the parental strain, suggesting that the capsule protects bacteria from the host immune response in the lungs [103]. More recently, Zhang et al. used an intrapulmonary in vivo model to identify AmpR, a regulator of the WcaJ enzyme that initiates capsule synthesis, as essential for the virulence of both hypermucoviscous and non-hypermucoviscous *K. pneumoniae* strains [111]. In addition,  $\Delta$ *rscB* and  $\Delta$ *rmpA* mutant strains had lung colo-

nization levels that were about 4-log lower than that of the parental strain KPPR1S at 24 h post-infection in an intranasal model of pneumonia in mice, and a  $\Delta rmpC$  strain was also attenuated by nearly 2 logs [87]. Unlike  $\Delta rmpA$  and  $\Delta rcsB$ , the  $\Delta rmpC$  mutants retained the hypermucoviscous phenotype, supporting the notion that this phenotype is not simply due to the overproduction of capsular polysaccharides and is not directly associated with virulence [87]. The expression of *rmpA* modulates capsule production under the control of the RcsB, KvrA, and KvrB regulators. Their deletion in hvKp strains decreased the bacterial virulence in an intranasal model of pneumonia in a mouse [82]. With the cKp strain, the deletion of *kvrA* also affected the virulence but had no effect on capsule gene expression or capsule-related phenotypes, suggesting that the effect of KvrA on virulence is not exclusively mediated by capsule production [82].



**Figure 2.** *K. pneumoniae* in the lungs in an in vivo murine model Local (respiratory) and distal (gut) microbiota (yellow, blue, green, and purple ovals) can modulate the host immune response to *K. pneumoniae* (red oval) lung infection and *K. pneumoniae* pathogenicity unlike dysbiotic gut microbiota (yellow, blue, green, and purple ovals, dotted line). Virulence factors involved in lung colonization by classic (cKp, right side) or hypervirulent (hvKp, left side) *K. pneumoniae* strains: **Capsule**, overproduced in hvKp and finely regulated by many pathways (FimK, RcsB, KvrA, KvrB, RmpA, RmpC); **Lipopolysaccharide (LPS)**, which depends on the *wecA* gene for the initiation of biosynthesis; **Membrane proteins** such as transporters and efflux pumps (MdtJ, CopA, ProU and AcrAB); **Siderophores** enterobactin (Ent) and yersiniabactin (Ybt) and FepB siderophore transporters are present in cKp, but their role in virulence and dissemination through the lung epithelial barrier via hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) stabilization was only characterized for the hvKp strains; **Critical fitness genes** involved in the synthesis of essential branched chain and aromatic amino acids (*leuABC*, *iloCD* and *aroE*) and RfaH transcriptional factor.

Many other bacterial factors involved in fitness during lung infections have been identified with global approaches in both in vivo models of pneumonia (intranasal and intrapulmonary infections). In 2007, Lau et al. used a PCR-based suppressive subtractive hybridization approach in an intrapulmonary mice model to compare two strains that differed significantly in their ability to cause disease: the classic IA565 and the hypervirulent KPPR1 strains [102]. In this model, the functions essential for causing pneumonia were related to the regulation of iron uptake, fimbrial-mediated adhesion, energy production and conversion, transcriptional regulation, signal transduction, restriction of endonuclease

activity, and membrane transport [102]. In 2015, Bachman et al. performed a screening of a KPPR1 *K. pneumoniae* transposon library after intrapulmonary inoculation combined with high-throughput sequencing similar to that used by Jung et al. to identify the factors involved in intestinal colonization by the ST258 strain [13,107]. The determination of the relative fitness of each mutant 24 h post-inoculation was based on the ratio of lung to inoculum read counts and the concordance in the location of transposon insertions. Over 300 mutants with at least a two-fold fitness defect in inducing lung infection and 69 with defects ranging from 10- to >2000-fold were identified. To validate the statistical approach using the CEDER *p* value as an efficient criterion to identify true-positive fitness genes in the lung, six isogenic mutants were constructed. Their subsequent individual analysis in an in vivo intrapulmonary model confirmed their fitness defect in the lung infection compared to the wild-type strain. Critical fitness genes included *rfaH*, which encodes a transcriptional factor involved in the transcription of several genes associated with virulence such as those involved in capsule and LPS production, those responsible for the synthesis of essential branched-chain and aromatic amino acids (*aroE*, *ilvC* and *ilvD*), and *copA*, which encodes a copper efflux pump required to prevent copper toxicity [107]. Another screening in an in vivo intranasal murine model with a global STM approach identified 106 mutants of the hvKp KPPR1 strain that failed to either colonize the lungs or disseminate to the spleen. The first gene of the “enterobacterial common antigen” (ECA) synthesis locus, which encodes the WecA enzyme, appears to be detrimental as it is required for spleen dissemination upon lung infection. Although WecA is involved in both ECA and LPS production, the attenuation in virulence in the lungs of *wecA* mutants is the result of defects in LPS rather than ECA deficiency [78]. Willsey et al. identified other virulence factors involved in bacterial survival in the lungs by analyzing the in vitro transcriptional response of the *K. pneumoniae* strain MGH78578 to a purified pulmonary surfactant, a phospholipid-rich mixture coating the alveolar surfaces that has a role in the reduction in surface tension and host immunity modulation. The behaviour of isogenic KPPR1 deletion mutants in surfactant-induced genes was further investigated in an intrapulmonary murine model of pneumonia. The study showed the importance of the MdtJII polyamine efflux pump and the ProU glycine betaine ABC transporter in pulmonary infection, and also the importance of the previously identified *leuABC* operon involved in branched-chain amino acid synthesis [109]. The involvement of other potential inner membrane transporters essential for hvKp in in vivo intrapulmonary models of infection such as the AcrAB efflux pump and PEG344 has also been reported [75,106]. More recently, Paczosa et al. characterized the *K. pneumoniae* virulence factors required to cause pneumonia in intranasally inoculated immunocompromised mice using a high-throughput screening of a transposon insertion mutant library [88]. They identified genes that promote the survival or growth of bacteria in the lungs in the presence of polymorphonuclear cells (PMNs), including the genes responsible for mucoviscosity phenotypes (*dsbC*, *wzm-wzt*, and *ycgE*), and in ROS- or reactive nitrogen species (RNS)-resistant (*dedA*, *gntR*, *yaaA*, and *ycgE*) [88].

In vivo intranasal and intrapulmonary murine models of pneumonia have also showed that certain siderophores (enterobactin, yersiniabactin, salmochelin, and aerobactin) are major virulence factors of hvKp, influencing pulmonary infections [77,85,108] (Figure 2). Mutants attenuated in the import or export of siderophores also have a limited virulence. For example, a *fepB* mutant, unable to process enterobactin and enterocholin through the periplasm, showed an attenuation of the bacterial burden in the lungs and was unable to disseminate to the spleen [80]. In addition to promoting bacterial survival and growth in the lung environment through their iron-chelating activities, siderophores secreted by *K. pneumoniae* in an intrapulmonary murine model contribute to activating the host stress responses by the induction of IL-6, CXCL1 and CXCL2 production and the stabilization of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), the master transcription factor. Secretions within the lungs of pro-inflammatory cytokines (IL-6, CXCL1, and CXCL2) are necessary to protect the host from *K. pneumoniae*. In contrast, siderophore-dependent stabilization of HIF-1 $\alpha$  has the opposite effect since it promotes bacterial dissemination from the lungs to the spleen.

Although the mechanism involved in this systemic spread is unknown, HIF-1 $\alpha$  is a global transcriptional factor that can control vascular permeability or induce the disruption of the epithelial barrier [108]. These data are consistent with those of a study published by Lawlor et al., who showed in a murine pulmonary model that *K. pneumoniae* mutants deficient in Ent and Ybt production inoculated intranasally in mice are significantly prevented from disseminating to the spleen after 96 h of infection [85]. Enterobactin, which is present in most *K. pneumoniae* isolates, is counteracted in the lungs by the host innate immunity protein lipocalin-2 (Lcn-2), which by a process of iron sequestration limits the acquisition of iron by bacteria. The production of alternative siderophores (Ybt or glycosylated Ent [called salmochelin]) thus allows *K. pneumoniae* to avoid the action of Lcn-2 and bacterial growth in perivascular spaces, and the resulting systemic dissemination [112,113]. A subsequent study showed in an intrapulmonary murine model of pneumonia that Ybt is likely to confer on bacteria limited potential to disseminate and cause blood infection compared to Ent. Indeed, Ybt activity is limited by transferrin, another host iron-binding protein that is present in perivascular spaces [113]. In contrast to all these findings, Russo et al. showed in an intrapulmonary murine model that aerobactin, unlike other siderophores, plays a predominant role during pulmonary infection, contrary to Ent, Ybt and Sal. These conflicting results could be due to differences in the overall production of siderophores among the hvKp strains [77].

Both intranasal and intrapulmonary inoculation methods contribute to obtaining an extended list of bacterial factors required for efficient infection of the lungs. The comparison of these technical approaches is still difficult as the use of both methods in a single study occurs rarely. However, the choice of the inoculation mode seems to be important in investigations into the host response and airway microbiota. Intranasal inoculation leads potentially to bacterial colonization of the upper respiratory tract. It is widely acknowledged that commensal flora has an impact on the behaviour of the pathogens but the role of the microbiota of the upper and lower respiratory tracts in the infection kinetics of *K. pneumoniae* is not fully understood.

#### 4.3. *K. pneumoniae* in the Lungs: Host Immune and Microbiota Responses

The host immune response to lung infection can be elicited either by *K. pneumoniae* itself or by modulation of the local (airway) or distal (gut) microbiota (Figure 2). The complex interplay between the host immune response and the pathways developed by the bacteria to counteract and evade host defences has been well described by Bengoechea and Pessoa and Gonzalez Ferrer et al. [6,25]. Upper respiratory microbiota and oral microbiota are still poorly documented but likely play a role in lung immunity states [154]. These microbiotas, along with the gut microbiota, can be activators of immune lung defences via the NLR ligands [89]. They could also provide a tool for the evaluation of the health status of the respiratory tract, since Morinaga et al. showed in an intrapulmonary model for mice that the alpha diversity of oropharyngeal microbiota is increased during pneumonia caused by *K. pneumoniae* [114].

The first insights into the “gut–lung axis” related to *K. pneumoniae* lung infections were reported by Fagundes et al., who showed that GF mice infected intranasally with *K. pneumoniae* had an increased bacterial burden in the lungs, a greater dissemination of the infection, and a lower survival rate than conventional mice [115]. The protective role of gut microbiota against *K. pneumoniae* pulmonary infection has been confirmed in other studies using intrapulmonary-infected GF or oral antibiotic-treated mice [89,90,115,116]. In both intranasal and intrapulmonary models, the lack of or the disruption of intestinal microbiota resulted in decreased proinflammatory cytokines, notably TNF- $\alpha$ , CXCL1, CXCL2 and IL-6, and increased levels of IL-10 anti-inflammatory cytokines in the lung tissue. A decrease in immune cell recruitment in the lungs, mainly of neutrophils and alveolar macrophages, has also been observed in microbiota-defective mice [89,90,115]. As the ROS-mediated killing of alveolar macrophages primarily drives antibacterial activity in the lungs, the absence of commensal microbiota leads to a defect in bacterial clearance from the lungs.



Pulmonary immune defences have shown to be restored by fecal transplant or oral transfer of the microbiota consortium, and by oral administration of NLR ligands (Nod1 and Nod2), which appear to be major receptors for the activation of lung defences by commensal flora [89,90].

The composition of microbial communities in the gut is thus likely to play an important role in the host's capacity to counteract a lung infection [155]. Members or phyla responsible for immune activation remain to be identified but there is evidence of the protective immune effect of beneficial bacteria. For instance, the administration of *Bifidobacterium logum* protected mice from lung infection after intranasal administration of *K. pneumoniae*, promoting bacterial clearance by the activation of the TLR-signaling pathway and ROS production by alveolar macrophages [116]. Likewise, oral gavage with *Lactobacillus plantarum* in mice subsequently infected intranasally by *K. pneumoniae* reduced the lung inflammatory response due to the low recruitment of macrophages and neutrophils and cytokine production (KC, IL-6 and TNF- $\alpha$ ) in BALF [84].

Intestinal dysbiosis is associated with an enhanced susceptibility to infection. However, inter-individual variation in microbiota composition does not influence the pathophysiology of *K. pneumoniae* lung infection. Indeed, vendor-specific differences in the gut microbiota composition in genetically similar mice have no impact on the response to *K. pneumoniae* lung infection [91].

## 5. Urinary Tract Infection

*K. pneumoniae* can infect the urinary tract of patients in either the absence or presence of endogenous material such as catheters causing, respectively, urinary tract infections (UTIs) or catheter-associated urinary tract infections (CAUTIs). Classical *K. pneumoniae* strains also lead to severe disseminated infections that are difficult to treat owing to their intrinsic antibiotic resistance [156,157]. Even if the urinary tract is an environment without a dense microbiota, bacteria have to use different mechanisms to overcome adverse events such as osmotic stress, starvation, and the host immune response. To adapt to this competitive environment, *K. pneumoniae* possesses multiple factors that allow its survival and effective colonization of the urinary tract. Only a few in vivo studies have been performed using urinary models of infection in mice, probably because of the relative complexity of the experimental procedure, which prompts authors to use rats rather than mice.

To mimic UTIs, murine models (mice or rats) involve the emptying of the animal bladder by gentle pressure and then inoculating transurethrally a bacterial suspension ( $10^7$  to  $10^8$  CFU in 50  $\mu$ L) (Table 1) [46,123]. Fader et al. provided the first evidence of the attachment of *K. pneumoniae* to the urinary epithelium in 1980 using an in vivo model of infection of the rat bladder and showed the importance of fimbriae in adhesion to the urinary epithelium and in the severity of the UTI [124]. Further studies have since identified the specific role of adhesion to the epithelial cells of type 1 pili that allows the initiation of the infection and bacterial survival within the bladder [31,46,125]. This adhesion phenotype requires the FimH adhesin, which recognizes mannosylated glycoprotein onto uroepithelium, as shown for the uropathogen *E. coli* (UPEC) [126,158]. The analysis of the phase-variable expression of *fim* genes in *K. pneumoniae* showed that the orientation of the *fim* switch is on the "on" state during urinary colonization [31]. Nevertheless, *K. pneumoniae* induces a urinary infection with lower bacterial loads than UPEC strains, especially at the early time points of the infection process [126–128]. This could be explained by the significant functional differences between the FimH adhesin of UPEC and that of *K. pneumoniae* (adhesin domain specificity, mannose-sensitive hemagglutination [MSHA] phenotype), despite their highly homologous amino acid sequences and predicted structures [126]. In addition, *K. pneumoniae* could be programmed for a minimal expression of type 1 pili since the presence of an extra *fimK* gene in the *fim* operon, unlike in *E. coli*, strengthens type 1 pili repression in the bladder [127]. The balance regulation of fimbriae expression is therefore essential for bacterial in vivo colonization of the urinary site. A *K. pneumoniae* K2 mutant deficient for the KpfR transcriptional repressor of a type 1-like fimbriae that

exhibited a hyperfimbriated phenotype colonized the mouse bladder less extensively than the wild-type strain 24 h post-infection and was more rapidly eliminated from the urinary tract [129]. The specific role of the *K. pneumoniae* type 3 surface adhesin (Mrk) has also been investigated in murine models of urinary tract infection. Although the deletion of *mrk* genes in *K. pneumoniae* did not affect the virulence of the bacteria in a study published by Struve et al., another study carried out by Murphy et al. showed that a  $\Delta mrk$  deletion mutant colonized the bladder at a lower level than the wild-type strain [121,131]. One explanation of these paradoxical findings would be that the inability of a  $\Delta mrk$  mutant to produce type 3 pili is compensated by an enhanced expression of type 1 fimbriae [121].

Capsular polysaccharides are also involved in the urovirulence of *K. pneumoniae*. The use of a rat model of urinary tract infection showed that a non-capsulated strain had lower bacterial loads in the bladder, kidneys, and urine than its encapsulated counterpart, with no difference in pathogen clearance [123]. Later, Struve and Krogfelt compared wild-type and non-capsulated mutants of two strains belonging to two different K serotypes [122]. They showed that higher bacterial burdens were recovered from the bladder of mice infected with parental strains than in those infected with their non-capsulated derived mutants in both individual and competitive assays, and irrespective of the capsular serotype [122]. Additionally, the importance of the capsule in urinary infections was confirmed by a screening of a library of mutants in a murine model of a UTI in which two mutants affected in fucose production, a major component of the K16 capsule serotype, were identified as deficient in relation to bladder colonization [46]. LPS is also involved to a much greater extent than capsular polysaccharides in urinary tract infections. Camprubi et al. showed that an O-antigen LPS mutant had a lower rate of cystitis and pyelonephritis induction in rats than the wild-type strain, with a 2-log reduction in the bacterial burden in the bladder, kidneys, and urine, independent of the presence of K-antigen [123]. Finally, *K. pneumoniae* mutants lacking the O5-antigen showed a drastic reduction in the urinary tract colonization in rats, with lower CFU counts in the bladder, kidneys, and urine compared to the parental strain [130]. The roles of surface polysaccharides involved in *K. pneumoniae* virulence in urinary sites are likely to be the same as those already described in other sites of infection, consisting notably in the resistance to and the evasion of host immunity [4,6].

As diabetic patients are more susceptible to UTIs caused by diverse uropathogens than non-diabetic subjects, Rosen et al. investigated the pathophysiology of the infections by comparing the uropathogen virulence in a diabetic murine model [128]. As observed with UPEC strains, *K. pneumoniae* was able to colonize the bladders of diabetic mice more efficiently than those of nondiabetic mice. Interestingly, *K. pneumoniae* exhibited greater differences in the bacterial burden in the bladder between diabetic and healthy mice than the UPEC strain did. In competition assays, although *K. pneumoniae* was outcompeted by UPEC strains in the bladder of healthy animals, diabetic status gives a greater advantage to *K. pneumoniae*, as evidenced by the clinical prevalence of *K. pneumoniae* cystitis in diabetic patients [128]. The high glucose content in the urine of diabetic individuals could explain this prevalence and so the authors grew *K. pneumoniae* and UPEC strains in healthy human urine supplemented with 2% glucose. The presence of glucose increased the growth rate of both strains at similar levels, which indicates that the advantages conferred to *K. pneumoniae* by diabetic status are not glucose-driven [128]. Other mechanisms potentially involved in the effective colonization of diabetic individuals by *K. pneumoniae*, which may result from bacterial immune evasion or immune defects of those with the disease (neutrophil dysfunction, cytokine production), need to be investigated.

In CAUTIs, the urinary catheter provides an abiotic surface for bacterial attachment and thus facilitates long-term colonization through the formation of a biofilm. Only one murine model of CAUTI caused by *K. pneumoniae* has so far been described. It involves the insertion of a short segment of a silicone tube directly into the murine bladder by the urethral route followed by the transurethral inoculation of a bacterial suspension, as previously described in a UTI model (Table 1) [131]. The use of “catheterized” murine models showed that the bacterial load in the bladder of implanted mice was significantly higher

than that in catheter-free mice, and even more so when implantation was conducted 24 h before inoculation rather than simultaneously. These data support the idea that exogenous material in the bladder is rapidly coated by host molecules to form a conditioning film, which promotes bacterial colonization and persistence in the host, notably through type 1 and type 3 pili expression in most clinical *K. pneumoniae* isolates [131,159]. Using the murine “catheterized” model described above, Murphy et al. demonstrated that type 1 and type 3 pili play a distinct role in the bacterial colonization of mouse bladders with implanted tubes [131]. In assays in which silicone tube implantation and bacterial infection occurred simultaneously, both type 1 and type 3 pili were essential for bladder and catheter colonization, but in assays in which the silicone tube was inserted 24 h before the infection, only mutants lacking at least type 3 pili were significantly impaired in the colonization of both the bladder and implants. Thus, in all likelihood, type 1 pili are involved in the first step of the colonization process in the urinary tract of mice and type 3 pili are involved mainly in the adhesion to the material coated with the host molecules, suggesting that their role prevails over that of type 1 pili in the presence of a preconditioned catheter at a later time point (48 h). These findings are consistent with the well-characterized role of type 3 pili in biofilm formation. However, mutants deficient in both type 1 and type 3 pili are not completely abolished in this urinary infection model, which provides evidence that the infectious process is multifactorial and could involve additional adhesins [131].

The urinary infections seen in primary health care are often diagnosed by an assessment of clinical signs (such as fever, inflammatory state, results of a cytobacteriological urine examination) and infection is established only if bacterial concentration in the urine reaches a threshold that is dependent on the general health of the patient. However, in animal experimental models, the urovirulence of bacteria is often evaluated only by a determination of the bacterial burden in the urinary tract, without taking into account the clinical signs of infection. It would be of interest to expand the readouts of the urinary models to have an overall assessment of the disease. Urinary infection models allow the identification of the bacterial factors essential for the uropathogenicity of *K. pneumoniae* but are insufficient to fully explain the pathophysiology of associated urinary infections. The main risk of urinary infection is the presence of a urinary catheter that is colonized by an endoluminal or an exoluminal route. The preventive strategies of urinary infections stem largely from the understanding of these colonization mechanisms. However, few studies have evaluated the role of the exo- or endoluminal route in the colonization of urinary catheters, notably in intensive care units.

## 6. Role of Animal Models in the Development of New Therapies against *K. pneumoniae* Infections

Animal models, which can be used to monitor bacterial virulence and the host immune response, are essential to develop and test innovative therapeutic strategies. The most promising approaches are being developed to (i) assess the efficacy of natural or chemical agents, (ii) modulate the host immunity by controlling the intestinal microbiota or (iii) mimic the vaccination processes in immunized animals.

### 6.1. Animal Models to Assess the Efficacy of Natural or Chemical Agents

Molecules with a broad range of bactericidal activity are an alternative to classical antibiotic treatments. In healthy and immunosuppressed pulmonary infection models, the intravenous injection of the short synthetic  $\beta$ -sheet folding peptide IRIKIRIK (IK8L) or the intraperitoneal injection of polyionene polymers has been shown to improve the survival of mice during hvKp or MDR *K. pneumoniae* infection. Both treatments reduce the bacterial burden in tissues (lung, blood, liver, spleen, and kidney) and infection-induced injuries in the lungs [81,92]. In addition, the administration of IK8L attenuates the inflammatory response by decreasing immune cell recruitment in the lungs and by reducing the production of pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) through JAK/STAT3 signalling [92]. Recently, the AA139 peptide, known for its bactericidal activity through the modulation of membrane phospholipids, entrapped in polymeric nanoparticles

(PNP) or in lipid-core micelles (MCL), was administered by endotracheal aerosolization to rats with ESBL *K. pneumoniae* pulmonary infection. The administration of AA139-PNP resulted in a rapid but short-lasting decrease (6 h) in the bacterial load in the lungs. In contrast, the administration of AA139-MCL produced a slow but prolonged decrease in the bacterial load in the lungs that persisted for at least 24 h. Both entrapped treatments given daily for 10 days to infected rats significantly increased survival in comparison to rats treated with free AA139 or a placebo [117]. The antimicrobial properties of carvacrol, a plant phenolic monoterpene, against *K. pneumoniae* were recently evaluated in a systemic infection model. After peritoneal injection of a LD50 dose of a MDR *K. pneumoniae* strain, oral gavage with carvacrol (10, 25 or 50 mg/kg) increased the survival of the mouse and reduced the bacterial load in the peritoneal lavage fluid 24 h post-infection [65].

A more specific alternative treatment is the use of narrow-spectrum molecules to directly target the pathogen. For instance, synthetic nucleic acid analogues called phosphorodiamidate morpholino oligomers (PPMOs) are antimicrobial molecules that inhibit bacterial growth in a pulmonary infection model. The PPMOs, conjugated with an arginine-rich peptide, penetrate across the outer membrane of the bacteria, and prevent the translation of a specific *K. pneumoniae* essential gene by selectively binding mRNA in an antisense manner. The intranasal administration of AcpP-PPMO targeting the *acpP* gene involved in the biosynthesis of fatty acids and phospholipids improved the survival of mice in a dose-dependent manner and reduced the bacterial burden by 3-log in the lungs [93]. Phage-therapy, another alternative treatment, was studied in a murine model of pneumonia and proved effective to reduce *K. pneumoniae* infections [94–96]. Using phage SS specific to the *K. pneumoniae* strain B5055, Chhibber et al. showed that an intraperitoneal injection of phages in mice shortly before (3 h and 6 h) or at the same time as the intranasal *K. pneumoniae* infection, significantly reduced the lung bacterial counts and achieved the complete clearance of the bacteria compared to untreated mice [94]. Compared to the intraperitoneal route, the nasal administration of phages is closer to the clinical route of delivery, which consists in drug nebulisation for local infections such as pneumonia, and delays phage clearance by the host immunity [95]. A local treatment by intranasal injections of different doses of the bacteriophage 1513 ( $2 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^8$ , or  $2 \times 10^7$  PFU/mouse) was also effective to treat lethal pneumonia caused by the MDR *K. pneumoniae* strain in mice. In addition to improving the survival of mice, the treatment with phage 1513 reduces lung injuries, the bacterial burden, and inflammatory cytokine productions (TNF- $\alpha$  and IL-6) in the lungs compared to PBS treatment [95]. More recently, similar results were obtained with phage BPA43, which reduced the lung bacterial loads and the tissue lesion severity in a *K. pneumoniae*-induced pneumonia model after a single intranasal dose of phage 2 h post-infection [96].

Animal models are a very interesting tool to test innovative chemical antibacterial agents against pathogenic *K. pneumoniae* involved in bacteremia and bronchopneumonia and will be necessary to predict adverse effects on microbiota communities such as dysbiosis or development of resistance.

## 6.2. Animal Models with Controlled Intestinal Microbiota

As mentioned in Section 4.3. (*K. pneumoniae* in the lungs: host immune and microbiota responses), daily gavage of beneficial bacteria (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) is a promising strategy to prevent *K. pneumoniae* lung infections via a modulation of the immune response through the activation of the gut–lung axis. These data highlight the importance of the gut microbiota in producing an immunomodulatory effect on distal sites such as the pulmonary environment. However, in vivo models using beneficial bacteria have so far focused more on the effects of prevention on infection than on the therapeutic effects against an already established infection. In the case of systemic hvKp infection, mice exhibited significantly altered intestinal microbiota characterized by a decreased abundance of *Ruminococcaceae* that correlated with a reduction in secondary bile acid (SBA) production. Interestingly, oral treatment of mice with SBAs (deoxycholic acid [DCA] and lithocholic acid [LCA])

significantly improved the survival rate of infected mice, and reduced the bacterial load and the inflammatory response in the liver and blood [66]. The intestinal microbiota thus plays a pivotal role in the maintenance of health, and murine models provide the opportunity to identify significant alterations in the structure of intestinal communities in order to potentially develop targeted clinical diagnosis or treatments of *Klebsiella* infections.

### 6.3. Immunized Animal Model Mimicking the Vaccination Processes

The activation of adaptive immunity, humoral immunity (mediated by antibodies) and cellular (mediated by T-cells) immunity, is primordial to obtain the effective eradication of bacterial infections. Capsular polysaccharides are one of the most immunogenic virulence factors of *K. pneumoniae* that could be used as an effective antigen for host immunization. The ability of anti-CPS antibodies to inhibit infection was first evaluated by Cryz et al. in a rat model of lung infection [73]. Intramuscular immunization of rats with anti-K2 CPS antibodies 14 days before intrapulmonary challenge with a K2 serotype *K. pneumoniae* strain promoted bacterial clearance from the lungs, reduced pathological lung alterations, and prevented bacteremia [73]. Likewise, protection against lung infection has also been observed in mice immunized with two K1-CPS-specific monoclonal antibodies (mAbs) [61]. Briefly, mice treated with either one or both mAbs 2 h before the intraperitoneal injection of K1 hvKp or 24 h before the intratracheal inoculation of K1 hvKp had enhanced survival rates and a drastic decrease in bacterial CFU levels in the lungs, liver, and spleen tissues at 24 h post-infection compared to PBS treated mice. Using an intravital microscopy approach, the authors also showed that mAb treatment enhanced opsonophagocytic action by Kupffer cells, a key component of the hepatic innate immune system [61]. CPS are not the only surface compound with immune-protective potential in murine models of pneumonia. Intramuscular or intranasal administrations of at least 50 µg of purified *K. pneumoniae* LPS two weeks before lung infection led to a 2.2- and 2.5-log decrease in bacterial load in the lungs, respectively. However, even at the lower doses (25µg), the intranasal administration of LPS was associated with adverse damage to the lung tissue by the potent inflammatory response. Intramuscular administration thus seems to be the most suitable route for the administration of LPS-based vaccines [97]. Whatever the case, even after intramuscular administration, free LPS can trigger pyrogenic and toxic effects in mice. To counteract these effects, Chhibber et al. incorporated the LPS into phospholipid vesicles (liposomes), which led to a 10-fold reduction in toxicity compared to the administration of free LPS [118]. In a model of lung infection in rats, the intramuscular injection of liposome-incorporated LPS limited the bacterial burden in lung tissues, at similar levels to those obtained in free LPS-treated rats. Animals treated with liposomal LPS exhibited efficient innate and adaptive immune responses against *K. pneumoniae* lung infection, but with a lower kinetics of efficacy than with free LPS (4 days after treatment with liposomal LPS versus 4 h with free LPS). However, the activation of the humoral specific immune response, measured by the number of antibody-forming cells, was significantly higher in animals treated with liposomal LPS than in those treated with free LPS [118]. The perspective to develop a non-living complex vaccine against *K. pneumoniae* was strengthened by the use of *Klebsiella*-derived extracellular vesicles (EVs), which prevented bacteria-induced lethality in an in vivo mouse sepsis model. In a sepsis model, naive mice treated by intraperitoneal injection of either sera from EV-immunized mice or splenocyte extracted from EV-immunized mice had higher survival rates than naive mice treated with splenocytes or sera from sham-immunized mice. These findings confirm the protective effect of the *K. pneumoniae* EV vaccination conferred by both cellular and humoral immunity [70]. In a lung infection model in mice, *K. pneumoniae* mutants attenuated in virulence can also be good candidates for live-vaccine development. The immunization of mice by intranasal inoculation with a non-capsulated  $\Delta cpsB$  mutant 6 weeks before pulmonary infection with its virulent wild-type parental strain significantly enhanced survival compared to that observed in non-immunized mice [79]. Protective immunization was also effective after the orogastric inoculation of an avirulent mutant of hvKp. Indeed, oral administration of  $10^7$  CFU of a hvKp CG43 avirulent mutant deficient

in uracil permease protected mice against a second oral infection 6 weeks later with the wild-type strain compared to non-immunized mice [49]. In addition, intraperitoneal immunization with avirulent hvKp OMPs ( $\Delta pal$  and  $\Delta lppA$ ) or CPS ( $\Delta magA$ ) mutants delayed mice mortality after the intraperitoneal injection of the wild-type strain 4 weeks after immunization compared to non-immunized mice. The immunization of mice with  $\Delta lppA$  mutant strains achieved 100% survival up to 28 days whereas only 25% of non-immunized control mice survived within 6 days of infection [64]. In another study, the immunization of mice with the K2044  $\Delta magA$  mutant ( $K^- O1$ ) showed a protective effect against hvKp infection, with a more protective effect against the hvKp O2 LPS strain. Compared to full mortality within 6 days in the unimmunized control group, 62.5% of the immunized mice survived without any symptoms of disease for 28 days after the challenge with A4528 (O1:K2), but only 12.5% of the immunized mice survived within 19 days of NTUH-K2044 (O1:K1) infection. The protective effect was attributed to the production of an antiserum against LPS O1 with more efficacy against the A4528 strain (O1:K2) because the capsule would mask the O1 antigen in the K2044 strain (O1:K1) [63].

Altogether, these results should encourage the development of in vivo models to investigate alternative therapeutics that have robust and specific antibacterial efficacy, negligible toxicity, and the ability to limit the development of resistance.

## 7. Conclusions

Owing to the emergence of hypervirulent strains and the pivotal role of *K. pneumoniae* in the initial acquisition and spreading of antibiotic-resistant genes, the infections caused by this pathogen are increasingly difficult to treat and pose a direct threat to human health. To date, in vivo murine models are the most reliable model to identify the complex interactions between the pathogen and its host in parallel with the development of innovative prophylactic or therapeutic approaches. Because animal models raise ethical questions, the development of non-invasive approaches should be extended to reduce the number of experimental animals and to replace them with alternative in vivo models (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Dyctiostelium discoideum*, *Danio rerio*, *Galleria mellonella*) [25].

Although many bacterial functions have now been characterized, the infection biology of *K. pneumoniae* is still poorly understood. New overall approaches are needed that take into account the genetic background of the host and bacterial diversity and tropism. Indeed, the use of the *K. pneumoniae* strains with genetic diversity in such integrative approaches could permit the exploration of the functional variation of specific virulent determinants [10]. Current mouse models fail to mirror the extensive genetic diversity that exists in the human population that could have an effect on the pathophysiology of infection. The use of innovative experimental systems such as the Collaborative Cross (CC), whose genetic diversity matches that of humans would help to better understand how genetics influence infectious disease [160]. Finally, whereas little is known about the population structure of *K. pneumoniae*, which has a highly genetic diversity, future studies should be aware of the bacterial diversity and bacterial evolution.

**Author Contributions:** Conceptualization—Conceived by L.J., T.M., D.B. and S.M.; Writing—original draft preparation, L.J., T.M., D.B. and S.M.; Writing—review and editing, L.J., T.M., D.B., S.M. and C.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** L.J. and T.M. were supported by a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. D.B. acknowledges the support received from the Agence Nationale de la Recherche of the French government through the program "Investissements d'Avenir" (16-IDEX-0001 CAP 20-25).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Bagley, S.T. Habitat Association of *Klebsiella* Species. *Infect. Control* **1985**, *6*, 52–58. [[CrossRef](#)]
2. Podschun, R.; Pietsch, S.; Höller, C.; Ullmann, U. Incidence of *Klebsiella* Species in Surface Waters and Their Expression of Virulence Factors. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 3325–3327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Donskey, C.J. The Role of the Intestinal Tract as a Reservoir and Source for Transmission of Nosocomial Pathogens. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, *39*, 219–226. [[CrossRef](#)]
4. Paczosa, M.K.; Meccas, J. *Klebsiella Pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2016**, *80*, 629–661. [[CrossRef](#)]
5. Podschun, R.; Ullmann, U. *Klebsiella* Spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin. Microbiol. Rev.* **1998**, *11*, 589–603. [[CrossRef](#)]
6. Gonzalez-Ferrer, S.; Peñaloza, H.F.; Budnick, J.A.; Bain, W.G.; Nordstrom, H.R.; Lee, J.S.; Van Tyne, D. Finding Order in the Chaos: Outstanding Questions in *Klebsiella Pneumoniae* Pathogenesis. *Infect. Immun.* **2021**, *89*, e00693-20. [[CrossRef](#)]
7. Holt, K.E.; Wertheim, H.; Zadoks, R.N.; Baker, S.; Whitehouse, C.A.; Dance, D.; Jenney, A.; Connor, T.R.; Hsu, L.Y.; Severin, J.; et al. Genomic Analysis of Diversity, Population Structure, Virulence, and Antimicrobial Resistance in *Klebsiella Pneumoniae*, an Urgent Threat to Public Health. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, E3574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Grall, N.; Andremont, A.; Armand-Lefèvre, L. Résistance aux carbapénèmes: Vers une nouvelle impasse? *J. Anti-Infect.* **2011**, *13*, 87–102. [[CrossRef](#)]
9. Wyres, K.L.; Holt, K.E. *Klebsiella Pneumoniae* as a Key Trafficker of Drug Resistance Genes from Environmental to Clinically Important Bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **2018**, *45*, 131–139. [[CrossRef](#)]
10. Wyres, K.L.; Lam, M.M.C.; Holt, K.E. Population Genomics of *Klebsiella Pneumoniae*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 344–359. [[CrossRef](#)]
11. Gorrie, C.L.; Mirčeta, M.; Wick, R.R.; Edwards, D.J.; Thomson, N.R.; Strugnell, R.A.; Pratt, N.F.; Garlick, J.S.; Watson, K.M.; Pilcher, D.V.; et al. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella Pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. *Clin. Infect. Dis.* **2017**, *65*, 208–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Peña, C.; Pujol, M.; Ricart, A.; Ardanuy, C.; Ayats, J.; Liñares, J.; Garrigosa, F.; Ariza, J.; Gudiol, F. Risk Factors for Faecal Carriage of *Klebsiella Pneumoniae* Producing Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL-KP) in the Intensive Care Unit. *J. Hosp. Infect.* **1997**, *35*, 9–16. [[CrossRef](#)]
13. Jung, H.-J.; Littmann, E.R.; Seok, R.; Leiner, I.M.; Taur, Y.; Peled, J.; van den Brink, M.; Ling, L.; Chen, L.; Kreiswirth, B.N.; et al. Genome-Wide Screening for Enteric Colonization Factors in Carbapenem-Resistant ST258 *Klebsiella Pneumoniae*. *mBio* **2019**, *10*, e02663-18. [[CrossRef](#)]
14. Martin, R.M.; Cao, J.; Brisse, S.; Passet, V.; Wu, W.; Zhao, L.; Malani, P.N.; Rao, K.; Bachman, M.A. Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella Pneumoniae*. *mSphere* **2016**, *1*, e00261-16. [[CrossRef](#)]
15. Taur, Y.; Xavier, J.B.; Lipuma, L.; Ubeda, C.; Goldberg, J.; Gobourne, A.; Lee, Y.J.; Dubin, K.A.; Soccia, N.D.; Viale, A.; et al. Intestinal Domination and the Risk of Bacteremia in Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *55*, 905–914. [[CrossRef](#)]
16. Kabha, K.; Nissimov, L.; Athamna, A.; Keisari, Y.; Parolis, H.; Parolis, L.A.; Grue, R.M.; Schlepper-Schafer, J.; Ezekowitz, A.R.; Ohman, D.E. Relationships among Capsular Structure, Phagocytosis, and Mouse Virulence in *Klebsiella Pneumoniae*. *Infect. Immun.* **1995**, *63*, 847–852. [[CrossRef](#)]
17. Russo, T.A.; Marr, C.M. Hypervirulent *Klebsiella Pneumoniae*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, *32*, 42. [[CrossRef](#)]
18. Pomakova, D.K.; Hsiao, C.-B.; Beanan, J.M.; Olson, R.; MacDonald, U.; Keynan, Y.; Russo, T.A. Clinical and Phenotypic Differences between Classic and Hypervirulent *Klebsiella Pneumoniae*: An Emerging and under-Recognized Pathogenic Variant. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2012**, *31*, 981–989. [[CrossRef](#)]
19. Shon, A.S.; Bajwa, R.P.S.; Russo, T.A. Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella Pneumoniae*. *Virulence* **2013**, *4*, 107–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Li, J.; Huang, Z.Y.; Yu, T.; Tao, X.Y.; Hu, Y.M.; Wang, H.C.; Zou, M.X. Isolation and Characterization of a Sequence Type 25 Carbapenem-Resistant Hypervirulent *Klebsiella Pneumoniae* from the Mid-South Region of China. *BMC Microbiol.* **2019**, *19*, 219. [[CrossRef](#)]
21. Wu, K.-M.; Li, L.-H.; Yan, J.-J.; Tsao, N.; Liao, T.-L.; Tsai, H.-C.; Fung, C.-P.; Chen, H.-J.; Liu, Y.-M.; Wang, J.-T.; et al. Genome Sequencing and Comparative Analysis of *Klebsiella Pneumoniae* NTUH-K2044, a Strain Causing Liver Abscess and Meningitis. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 4492–4501. [[CrossRef](#)]
22. Kislichkina, A.A.; Lev, A.I.; Komisarova, E.V.; Fursova, N.K.; Myakinina, V.P.; Mukhina, T.N.; Bogun, A.A.; Volozhantsev, N.V. Genome Sequencing and Comparative Analysis of Three Hypermucoviscous *Klebsiella Pneumoniae* Strains Isolated in Russia. *Pathog. Dis.* **2017**, *75*. [[CrossRef](#)]
23. Li, W.; Sun, G.; Yu, Y.; Li, N.; Chen, M.; Jin, R.; Jiao, Y.; Wu, H. Increasing Occurrence of Antimicrobial-Resistant Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella Pneumoniae* Isolates in China. *BMC Microbiol.* **2014**, *58*, 225–232. [[CrossRef](#)]
24. Martin, R.M.; Bachman, M.A. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella Pneumoniae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 4. [[CrossRef](#)]
25. Bengoechea, J.A.; Sa Pessoa, J. *Klebsiella Pneumoniae* Infection Biology: Living to Counteract Host Defences. *FEMS Microbiol. Rev.* **2019**, *43*, 123–144. [[CrossRef](#)]

26. Caballero, S.; Carter, R.; Ke, X.; Sušac, B.; Leiner, I.M.; Kim, G.J.; Miller, L.; Ling, L.; Manova, K.; Pamer, E.G. Distinct but Spatially Overlapping Intestinal Niches for Vancomycin-Resistant *Enterococcus Faecium* and Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae*. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1005132. [CrossRef]
27. Lau, H.Y.; Huffnagle, G.B.; Moore, T.A. Host and Microbiota Factors That Control *Klebsiella Pneumoniae* Mucosal Colonization in Mice. *Microbes Infect.* **2008**, *10*, 1283–1290. [CrossRef] [PubMed]
28. Favre-Bonté, S.; Licht, T.R.; Forestier, C.; Krogfelt, K.A. *Klebsiella Pneumoniae* Capsule Expression Is Necessary for Colonization of Large Intestines of Streptomycin-Treated Mice. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 6152–6156. [CrossRef]
29. Perez, F.; Pultz, M.J.; Endimiani, A.; Bonomo, R.A.; Donskey, C.J. Effect of Antibiotic Treatment on Establishment and Elimination of Intestinal Colonization by KPC-Producing *Klebsiella Pneumoniae* in Mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 2585–2589. [CrossRef]
30. Maroncle, N.; Rich, C.; Forestier, C. The Role of *Klebsiella Pneumoniae* Urease in Intestinal Colonization and Resistance to Gastrointestinal Stress. *Res. Microbiol.* **2006**, *157*, 184–193. [CrossRef]
31. Struve, C.; Bojer, M.; Krogfelt, K.A. Characterization of *Klebsiella Pneumoniae* Type 1 Fimbriae by Detection of Phase Variation during Colonization and Infection and Impact on Virulence. *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 4055–4065. [CrossRef]
32. Khater, F.; Balestrino, D.; Charbonnel, N.; Dufayard, J.F.; Brisse, S.; Forestier, C. In Silico Analysis of Usher Encoding Genes in *Klebsiella Pneumoniae* and Characterization of Their Role in Adhesion and Colonization. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0116215. [CrossRef]
33. Coudeyras, S.; Nakusi, L.; Charbonnel, N.; Forestier, C. A Tripartite Efflux Pump Involved in Gastrointestinal Colonization by *Klebsiella Pneumoniae* Confers a Tolerance Response to Inorganic Acid. *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 4633–4641. [CrossRef]
34. Hsieh, P.; Lin, H.; Lin, T.; Wang, J. CadC Regulates *Cad* and *Tdc* Operons in Response to Gastrointestinal Stresses and Enhances Intestinal Colonization of *Klebsiella Pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **2010**, *202*, 52–64. [CrossRef]
35. Sequeira, R.P.; McDonald, J.A.K.; Marchesi, J.R.; Clarke, T.B. Commensal Bacteroidetes Protect against *Klebsiella Pneumoniae* Colonization and Transmission through IL-36 Signalling. *Nat. Microbiol.* **2020**, *5*, 304–313. [CrossRef]
36. Lagrèfeuille, R.; Miquel, S.; Balestrino, D.; Vareille-Delarbre, M.; Chain, F.; Langella, P.; Forestier, C. Opposing Effect of *Lactobacillus* on In Vitro *Klebsiella Pneumoniae* in Biofilm and in an In Vivo Intestinal Colonisation Model. *Benef. Microbes* **2018**, *9*, 87–100. [CrossRef]
37. Schjorring, S.; Struve, C.; Krogfelt, K.A. Transfer of Antimicrobial Resistance Plasmids from *Klebsiella Pneumoniae* to *Escherichia Coli* in the Mouse Intestine. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *62*, 1086–1093. [CrossRef]
38. Høyen, C.K.; Pultz, N.J.; Paterson, D.L.; Aron, D.C.; Donskey, C.J. Effect of Parenteral Antibiotic Administration on Establishment of Intestinal Colonization in Mice by *Klebsiella Pneumoniae* Strains Producing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3610–3612. [CrossRef]
39. Deshpande, A.; Hurlless, K.; Cadnum, J.L.; Chesnel, L.; Gao, L.; Chan, L.; Kundrapu, S.; Polinkovsky, A.; Donskey, C.J. Effect of Fidaxomicin versus Vancomycin on Susceptibility to Intestinal Colonization with Vancomycin-Resistant Enterococci and *Klebsiella Pneumoniae* in Mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 3988–3993. [CrossRef] [PubMed]
40. Pope, J.L.; Yang, Y.; Newsome, R.C.; Sun, W.; Sun, X.; Ukhanova, M.; Neu, J.; Issa, J.-P.; Mai, V.; Jobin, C. Microbial Colonization Coordinates the Pathogenesis of a *Klebsiella Pneumoniae* Infant Isolate. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 3380. [CrossRef]
41. Atarashi, K.; Suda, W.; Luo, C.; Kawaguchi, T.; Motoo, I.; Narushima, S.; Kiguchi, Y.; Yasuma, K.; Watanabe, E.; Tanoue, T.; et al. Ectopic Colonization of Oral Bacteria in the Intestine Drives  $T_H1$  Cell Induction and Inflammation. *Science* **2017**, *358*, 359–365. [CrossRef] [PubMed]
42. Garrett, W.S.; Gallini, C.A.; Yatsunenko, T.; Michaud, M.; DuBois, A.; Delaney, M.L.; Punit, S.; Karlsson, M.; Bry, L.; Glickman, J.N.; et al. Enterobacteriaceae Act in Concert with the Gut Microbiota to Induce Spontaneous and Maternally Transmitted Colitis. *Cell Host Microbe* **2010**, *8*, 292–300. [CrossRef] [PubMed]
43. Maroncle, N.; Balestrino, D.; Rich, C.; Forestier, C. Identification of *Klebsiella Pneumoniae* Genes Involved in Intestinal Colonization and Adhesion Using Signature-Tagged Mutagenesis. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 4729–4734. [CrossRef] [PubMed]
44. van Aartsen, J.J.; Stahlhut, S.G.; Harrison, E.M.; Crosatti, M.; Ou, H.-Y.; Krogfelt, K.A.; Struve, C.; Rajakumar, K. Characterization of a Novel Chaperone/Usher Fimbrial Operon Present on KpGI-5, a Methionine tRNA Gene-Associated Genomic Island in *Klebsiella Pneumoniae*. *BMC Microbiol.* **2012**, *12*, 59. [CrossRef]
45. Hennequin, C.; Forestier, C. OxyR, a LysR-Type Regulator Involved in *Klebsiella Pneumoniae* Mucosal and Abiotic Colonization. *IAI* **2009**, *77*, 5449–5457. [CrossRef]
46. Struve, C.; Forestier, C.; Krogfelt, K.A. Application of a Novel Multi-Screening Signature-Tagged Mutagenesis Assay for Identification of *Klebsiella Pneumoniae* Genes Essential in Colonization and Infection. *Microbiology* **2003**, *149*, 167–176. [CrossRef]
47. Lueschow, S.R.; Stumphy, J.; Gong, H.; Kern, S.L.; Elgin, T.G.; Underwood, M.A.; Kalanetra, K.M.; Mills, D.A.; Wong, M.H.; Meyerholz, D.K.; et al. Loss of Murine Paneth Cell Function Alters the Immature Intestinal Microbiome and Mimics Changes Seen in Neonatal Necrotizing Enterocolitis. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204967. [CrossRef]
48. Zhang, C.; Sherman, M.P.; Prince, L.S.; Bader, D.; Weitkamp, J.-H.; Slaughter, J.C.; McElroy, S.J. Paneth Cell Ablation in the Presence of *Klebsiella Pneumoniae* Induces Necrotizing Enterocolitis (NEC)-like Injury in the Small Intestine of Immature Mice. *Dis. Models Mech.* **2012**, *5*, 522–532. [CrossRef]
49. Tu, Y.-C.; Lu, M.-C.; Chiang, M.-K.; Huang, S.-P.; Peng, H.-L.; Chang, H.-Y.; Jan, M.-S.; Lai, Y.-C. Genetic Requirements for *Klebsiella Pneumoniae*-Induced Liver Abscess in an Oral Infection Model. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 2657–2671. [CrossRef]



50. Tang, H.-L.; Chiang, M.-K.; Liou, W.-J.; Chen, Y.-T.; Peng, H.-L.; Chiou, C.-S.; Liu, K.-S.; Lu, M.-C.; Tung, K.-C.; Lai, Y.-C. Correlation between *Klebsiella Pneumoniae* Carrying PLVPK-Derived Loci and Abscess Formation. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2010**, *29*, 689–698. [[CrossRef](#)]
51. Hsu, C.-R.; Chang, I.-W.; Hsieh, P.-F.; Lin, T.-L.; Liu, P.-Y.; Huang, C.-H.; Li, K.-T.; Wang, J.-T. A Novel Role for the *Klebsiella Pneumoniae* Sap (Sensitivity to Antimicrobial Peptides) Transporter in Intestinal Cell Interactions, Innate Immune Responses, Liver Abscess, and Virulence. *J. Infect. Dis.* **2019**, *219*, 1294–1306. [[CrossRef](#)]
52. Hsieh, P.-F.; Lu, Y.-R.; Lin, T.-L.; Lai, L.-Y.; Wang, J.-T. *Klebsiella Pneumoniae* Type VI Secretion System Contributes to Bacterial Competition, Cell Invasion, Type-1 Fimbriae Expression, and In Vivo Colonization. *J. Infect. Dis.* **2019**, *219*, 637–647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Tan, Y.H.; Chen, Y.; Chu, W.H.W.; Sham, L.-T.; Gan, Y.-H. Cell Envelope Defects of Different Capsule-Null Mutants in K1 Hypervirulent *Klebsiella Pneumoniae* Can Affect Bacterial Pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **2020**, *113*, 889–905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Hsu, C.-R.; Pan, Y.-J.; Liu, J.-Y.; Chen, C.-T.; Lin, T.-L.; Wang, J.-T. *Klebsiella Pneumoniae* Translocates across the Intestinal Epithelium via Rho GTPase- and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-Dependent Cell Invasion. *Infect. Immun.* **2015**, *83*, 769–779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Hsu, C.-R.; Lin, T.-L.; Chen, Y.-C.; Chou, H.-C.; Wang, J.-T. The Role of *Klebsiella Pneumoniae* RmpA in Capsular Polysaccharide Synthesis and Virulence Revisited. *Microbiology* **2011**, *157*, 3446–3457. [[CrossRef](#)]
56. Wu, J.H.; Tsai, C.G. Infectivity of Hepatic Strain *Klebsiella Pneumoniae* in Diabetic Mice. *Exp. Biol. Med.* **2005**, *230*, 757–761. [[CrossRef](#)]
57. Lin, S.-H.; Chung, P.-H.; Wu, Y.-Y.; Fung, C.-P.; Hsu, C.-M.; Chen, L.-W. Inhibition of Nitric Oxide Production Reverses Diabetes-Induced Kupffer Cell Activation and *Klebsiella Pneumoniae* Liver Translocation. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0177269. [[CrossRef](#)]
58. Moore, T.A.; Perry, M.L.; Getsoian, A.G.; Newstead, M.W.; Standiford, T.J. Divergent Role of Gamma Interferon in a Murine Model of Pulmonary versus Systemic *Klebsiella Pneumoniae* Infection. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 6310–6318. [[CrossRef](#)]
59. Wu, J.H.; Wu, A.M.; Tsai, C.G.; Chang, X.-Y.; Tsai, S.-F.; Wu, T.-S. Contribution of Fucose-Containing Capsules in *Klebsiella Pneumoniae* to Bacterial Virulence in Mice. *Exp. Biol. Med.* **2008**, *233*, 64–70. [[CrossRef](#)]
60. Pan, P.-C.; Chen, H.-W.; Wu, P.-K.; Wu, Y.-Y.; Lin, C.-H.; Wu, J.H. Mutation in Fucose Synthesis Gene of *Klebsiella Pneumoniae* Affects Capsule Composition and Virulence in Mice. *Exp. Biol. Med.* **2011**, *236*, 219–226. [[CrossRef](#)]
61. Diago-Navarro, E.; Calatayud-Baselga, I.; Sun, D.; Khairallah, C.; Mann, I.; Ulacia-Hernando, A.; Sheridan, B.; Shi, M.; Fries, B.C. Antibody-Based Immunotherapy to Treat and Prevent Infection with Hypervirulent *Klebsiella Pneumoniae*. *Clin. Vaccine Immunol.* **2017**, *24*, e00456-16. [[CrossRef](#)]
62. Fung, C.-P.; Chang, F.-Y.; Lin, J.-C.; Ho, D.M.-T.; Chen, C.-T.; Chen, J.-H.; Yeh, K.-M.; Chen, T.-L.; Lin, Y.-T.; Siu, L.K. Immune Response and Pathophysiological Features of *Klebsiella Pneumoniae* Liver Abscesses in an Animal Model. *Lab. Investig.* **2011**, *91*, 1029–1039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Hsieh, P.-F.; Lin, T.-L.; Yang, F.-L.; Wu, M.-C.; Pan, Y.-J.; Wu, S.-H.; Wang, J.-T. Lipopolysaccharide O1 Antigen Contributes to the Virulence in *Klebsiella Pneumoniae* Causing Pyogenic Liver Abscess. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e33155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Hsieh, P.-F.; Liu, J.-Y.; Pan, Y.-J.; Wu, M.-C.; Lin, T.-L.; Huang, Y.-T.; Wang, J.-T. *Klebsiella Pneumoniae* Peptidoglycan-Associated Lipoprotein and Murein Lipoprotein Contribute to Serum Resistance, Antiphagocytosis, and Proinflammatory Cytokine Stimulation. *J. Infect. Dis.* **2013**, *208*, 1580–1589. [[CrossRef](#)]
65. De Souza, G.H.d.A. In Vitro and In Vivo Antibacterial Activity Assays of Carvacrol: A Candidate for Development of Innovative Treatments against KPC-Producing *Klebsiella Pneumoniae*. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0246003. [[CrossRef](#)]
66. Zheng, Y.; Yue, C.; Zhang, H.; Chen, H.; Liu, Y.; Li, J. Deoxycholic Acid and Lithocholic Acid Alleviate Liver Injury and Inflammation in Mice with *Klebsiella Pneumoniae*-Induced Liver Abscess and Bacteremia. *J. Inflamm. Res.* **2021**, *14*, 777–789. [[CrossRef](#)]
67. Young, T.M.; Bray, A.S.; Nagpal, R.K.; Caudell, D.L.; Yadav, H.; Zafar, M.A. Animal Model to Study *Klebsiella Pneumoniae* Gastrointestinal Colonization and Host-to-Host Transmission. *Infect. Immun.* **2020**, *88*, e00071-20. [[CrossRef](#)]
68. Fang, C.-T.; Chuang, Y.-P.; Shun, C.-T.; Chang, S.-C.; Wang, J.-T. A Novel Virulence Gene in *Klebsiella Pneumoniae* Strains Causing Primary Liver Abscess and Septic Metastatic Complications. *J. Exp. Med.* **2004**, *199*, 697–705. [[CrossRef](#)]
69. Hsieh, P.-F.; Hsu, C.-R.; Chen, C.-T.; Lin, T.-L.; Wang, J.-T. The *Klebsiella Pneumoniae* YfgL (BamB) Lipoprotein Contributes to Outer Membrane Protein Biogenesis, Type-1 Fimbriae Expression, Anti-Phagocytosis, and In Vivo Virulence. *Virulence* **2016**, *7*, 587–601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Lee, W.-H.; Choi, H.-I.; Hong, S.-W.; Kim, K.; Gho, Y.S.; Jeon, S.G. Vaccination with *Klebsiella Pneumoniae*-Derived Extracellular Vesicles Protects against Bacteria-Induced Lethality via Both Humoral and Cellular Immunity. *Exp. Mol. Med.* **2015**, *47*, e183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Yeh, K.-M.; Lin, J.-C.; Yin, F.-Y.; Fung, C.-P.; Hung, H.-C.; Siu, L.-K.; Chang, F.-Y. Revisiting the Importance of Virulence Determinant MagA and Its Surrounding Genes in *Klebsiella Pneumoniae* Causing Pyogenic Liver Abscesses: Exact Role in Serotype K1 Capsule Formation. *J. Infect. Dis.* **2010**, *201*, 1259–1267. [[CrossRef](#)]
72. Russo, T.A.; Olson, R.; MacDonald, U.; Metzger, D.; Maltese, L.M.; Drake, E.J.; Gulick, A.M. Aerobactin Mediates Virulence and Accounts for Increased Siderophore Production under Iron-Limiting Conditions by Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella Pneumoniae*. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 2356–2367. [[CrossRef](#)]

73. Cryz, S.J.; Mortimer, P.; Cross, A.S.; Furer, E.; Germanier, R. Safety and Immunogenicity of a Polyvalent *Klebsiella* Capsular Polysaccharide Vaccine in Humans. *Vaccine* **1986**, *4*, 15–20. [[CrossRef](#)]
74. Krapp, F.; Morris, A.R.; Ozer, E.A.; Hauser, A.R. Virulence Characteristics of Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Strains from Patients with Necrotizing Skin and Soft Tissue Infections. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Bulger, J.; MacDonald, U.; Olson, R.; Beanan, J.; Russo, T.A. Metabolite Transporter PEG344 Is Required for Full Virulence of Hypervirulent *Klebsiella Pneumoniae* Strain HvKP1 after Pulmonary but Not Subcutaneous Challenge. *Infect. Immun.* **2017**, *85*, e00093-17. [[CrossRef](#)]
76. Russo, T.A.; Olson, R.; Fang, C.-T.; Stoesser, N.; Miller, M.; MacDonald, U.; Hutson, A.; Barker, J.H.; La Hoz, R.M.; Johnson, J.R.; et al. Identification of Biomarkers for Differentiation of Hypervirulent *Klebsiella Pneumoniae* from Classical *K. Pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **2018**, *56*, e00776-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Russo, T.A.; Olson, R.; MacDonald, U.; Beanan, J.; Davidson, B.A. Aerobactin, but Not Yersiniabactin, Salmochelin, or Enterobactin, Enables the Growth/Survival of Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella Pneumoniae* Ex Vivo and In Vivo. *Infect. Immun.* **2015**, *83*, 3325–3333. [[CrossRef](#)]
78. Lawlor, M.S.; Hsu, J.; Rick, P.D.; Miller, V.L. Identification of *Klebsiella Pneumoniae* Virulence Determinants Using an Intranasal Infection Model: *Klebsiella Pneumoniae* Intranasal STM. *Mol. Microbiol.* **2005**, *58*, 1054–1073. [[CrossRef](#)]
79. Lawlor, M.S.; Handley, S.A.; Miller, V.L. Comparison of the Host Responses to Wild-Type and CpsB Mutant *Klebsiella Pneumoniae* Infections. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 5402–5407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Palacios, M.; Broberg, C.A.; Walker, K.A.; Miller, V.L. A Serendipitous Mutation Reveals the Severe Virulence Defect of a *Klebsiella Pneumoniae* FepB Mutant. *mSphere* **2017**, *2*, e00341-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Lou, W.; Venkataraman, S.; Zhong, G.; Ding, B.; Tan, J.P.K.; Xu, L.; Fan, W.; Yang, Y.Y. Antimicrobial Polymers as Therapeutics for Treatment of Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Lung Infection. *Acta Biomater.* **2018**, *78*, 78–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Palacios, M.; Miner, T.A.; Frederick, D.R.; Sepulveda, V.E.; Quinn, J.D.; Walker, K.A.; Miller, V.L. Identification of Two Regulators of Virulence That Are Conserved in *Klebsiella Pneumoniae* Classical and Hypervirulent Strains. *mBio* **2018**, *9*, e01443-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Guilhen, C.; Miquel, S.; Charbonnel, N.; Joseph, L.; Carrier, G.; Forestier, C.; Balestrino, D. Colonization and Immune Modulation Properties of *Klebsiella Pneumoniae* Biofilm-Dispersed Cells. *NPJ Biofilms Microbiomes* **2019**, *5*, 25. [[CrossRef](#)]
84. Vareille-Delarbre, M.; Miquel, S.; Garcin, S.; Bertran, T.; Balestrino, D.; Evrard, B.; Forestier, C. Immunomodulatory Effects of *Lactobacillus Plantarum* on Inflammatory Response Induced by *Klebsiella Pneumoniae*. *Infect. Immun.* **2019**, *87*, e00570-19. [[CrossRef](#)]
85. Lawlor, M.S.; O'Connor, C.; Miller, V.L. Yersiniabactin Is a Virulence Factor for *Klebsiella Pneumoniae* during Pulmonary Infection. *Infect. Immun.* **2007**, *75*, 1463–1472. [[CrossRef](#)]
86. Yoshida, K.; Matsumoto, T.; Tateda, K.; Uchida, K.; Tsujimoto, S.; Yamaguchi, K. Role of Bacterial Capsule in Local and Systemic Inflammatory Responses of Mice during Pulmonary Infection with *Klebsiella Pneumoniae*. *J. Med. Microbiol.* **2000**, *49*, 1003–1010. [[CrossRef](#)]
87. Walker, K.A.; Miner, T.A.; Palacios, M.; Trzilova, D.; Frederick, D.R.; Broberg, C.A.; Sepulveda, V.E.; Quinn, J.D.; Miller, V.L. A *Klebsiella Pneumoniae* Regulatory Mutant Has Reduced Capsule Expression but Retains Hypermucoviscosity. *mBio* **2019**, *10*, 16. [[CrossRef](#)]
88. Paczosa, M.K.; Silver, R.J.; McCabe, A.L.; Tai, A.K.; McLeish, C.H.; Lazinski, D.W.; Meccas, J. Transposon Mutagenesis Screen of *Klebsiella Pneumoniae* Identifies Multiple Genes Important for Resisting Antimicrobial Activities of Neutrophils in Mice. *Infect. Immun.* **2020**, *88*, e00034-20. [[CrossRef](#)]
89. Brown, R.L.; Sequeira, R.P.; Clarke, T.B. The Microbiota Protects against Respiratory Infection via GM-CSF Signaling. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1512. [[CrossRef](#)]
90. Clarke, T.B. Early Innate Immunity to Bacterial Infection in the Lung Is Regulated Systemically by the Commensal Microbiota via Nod-Like Receptor Ligands. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 4596–4606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Wolff, N.S.; Jacobs, M.C.; Haak, B.W.; Roelofs, J.J.T.H.; de Vos, A.F.; Hugenholtz, F.; Wiersinga, W.J. Vendor Effects on Murine Gut Microbiota and Its Influence on Lipopolysaccharide-Induced Lung Inflammation and Gram-Negative Pneumonia. *Intensive Care Med. Exp.* **2020**, *8*, 47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Tan, S.; Gan, C.; Li, R.; Ye, Y.; Zhang, S.; Wu, X.; Yang, Y.Y.; Fan, W.; Wu, M. A Novel Chemosynthetic Peptide with  $\beta$ -Sheet Motif Efficiently Kills *Klebsiella Pneumoniae* in a Mouse Model. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 1045–1059. [[CrossRef](#)]
93. Geller, B.L.; Li, L.; Martinez, F.; Sully, E.; Sturge, C.R.; Daly, S.M.; Pybus, C.; Greenberg, D.E. Morpholino Oligomers Tested In Vitro, in Biofilm and In Vivo against Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 1611–1619. [[CrossRef](#)]
94. Chhibber, S.; Kaur, S.; Kumari, S. Therapeutic Potential of Bacteriophage in Treating *Klebsiella Pneumoniae* B5055-Mediated Lobar Pneumonia in Mice. *J. Med. Microbiol.* **2008**, *57*, 1508–1513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Cao, F.; Wang, X.; Wang, L.; Li, Z.; Che, J.; Wang, L.; Li, X.; Cao, Z.; Zhang, J.; Jin, L.; et al. Evaluation of the Efficacy of a Bacteriophage in the Treatment of Pneumonia Induced by Multidrug Resistance *Klebsiella Pneumoniae* in Mice. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 1–9. [[CrossRef](#)]
96. Anand, T. Phage Therapy for Treatment of Virulent *Klebsiella Pneumoniae* Infection in a Mouse Model. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2020**, *8*. [[CrossRef](#)]

97. Yadav, V.; Sharma, S.; Harjai, K.; Mohan, H.; Chhibber, S. Lipopolysaccharide-Mediated Protection against *Klebsiella Pneumoniae*-Induced Lobar Pneumonia: Intranasal vs. Intramuscular Route of Immunization. *Folia Microbiol.* **2005**, *50*, 83–86. [[CrossRef](#)]
98. Yoshida, K.; Matsumoto, T.; Tateda, K.; Uchida, K.; Tsujimoto, S.; Yamaguchi, K. Induction of Interleukin-10 and down-Regulation of Cytokine Production by *Klebsiella Pneumoniae* Capsule in Mice with Pulmonary Infection. *J. Med. Microbiol.* **2001**, *50*, 456–461. [[CrossRef](#)]
99. Domenico, P.; Johanson, W.G.; Straus, D.C. Lobar Pneumonia in Rats Produced by Clinical Isolates of *Klebsiella Pneumoniae*. *Infect. Immun.* **1982**, *37*, 327–335. [[CrossRef](#)]
100. Broug-Holub, E.; Toews, G.B.; van Iwaarden, J.F.; Strieter, R.M.; Kunkel, S.L.; Paine, R.; Standiford, T.J. Alveolar Macrophages Are Required for Protective Pulmonary Defenses in Murine *Klebsiella Pneumoniae*: Elimination of Alveolar Macrophages Increases Neutrophil Recruitment but Decreases Bacterial Clearance and Survival. *Infect. Immun.* **1997**, *65*, 1139–1146. [[CrossRef](#)]
101. Deng, J.C.; Zeng, X.; Newstead, M.; Moore, T.A.; Tsai, W.C.; Thammickal, V.J.; Standiford, T.J. STAT4 Is a Critical Mediator of Early Innate Immune Responses against Pulmonary *Klebsiella* Infection. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 4075–4083. [[CrossRef](#)]
102. Lau, H.Y.; Clegg, S.; Moore, T.A. Identification of *Klebsiella Pneumoniae* Genes Uniquely Expressed in a Strain Virulent Using a Murine Model of Bacterial Pneumonia. *Microb. Pathog.* **2007**, *42*, 148–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Rosen, D.A.; Hilliard, J.K.; Tiemann, K.M.; Todd, E.M.; Morley, S.C.; Hunstad, D.A. *Klebsiella Pneumoniae* FimK Promotes Virulence in Murine Pneumonia. *J. Infect. Dis.* **2016**, *213*, 649–658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Rosen, D.A.; Twentyman, J.; Hunstad, D.A. High Levels of Cyclic Di-GMP in *Klebsiella Pneumoniae* Attenuate Virulence in the Lung. *Infect. Immun.* **2017**, *86*, e00647-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Cortés, G.; Borrell, N.; de Astorza, B.; Gómez, C.; Sauleda, J.; Albertí, S. Molecular Analysis of the Contribution of the Capsular Polysaccharide and the Lipopolysaccharide O Side Chain to the Virulence of *Klebsiella Pneumoniae* in a Murine Model of Pneumonia. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 2583–2590. [[CrossRef](#)]
106. Padilla, E.; Llobet, E.; Doménech-Sánchez, A.; Martínez-Martínez, L.; Bengoechea, J.A.; Albertí, S. *Klebsiella Pneumoniae* AcrAB Efflux Pump Contributes to Antimicrobial Resistance and Virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 177–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Bachman, M.A.; Breen, P.; Deornellas, V.; Mu, Q.; Zhao, L.; Wu, W.; Cavalcoli, J.D.; Mobley, H.L.T. Genome-Wide Identification of *Klebsiella Pneumoniae* Fitness Genes during Lung Infection. *mBio* **2015**, *6*, e00775-15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Holden, V.I.; Breen, P.; Houle, S.; Dozois, C.M.; Bachman, M.A. *Klebsiella Pneumoniae* Siderophores Induce Inflammation, Bacterial Dissemination, and HIF-1 $\alpha$  Stabilization during Pneumonia. *mBio* **2016**, *7*, e01397-16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Willsey, G.G.; Ventrone, S.; Schutz, K.C.; Wallace, A.M.; Ribis, J.W.; Suratt, B.T.; Wargo, M.J. Pulmonary Surfactant Promotes Virulence Gene Expression and Biofilm Formation in *Klebsiella Pneumoniae*. *Infect. Immun.* **2018**, *86*, e00135-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Chhibber, S.; Aggarwal, S.; Yadav, V. Contribution of Capsular and Lipopolysaccharide Antigens to the Pathogenesis of *Klebsiella Pneumoniae* Respiratory Tract Infection. *Folia Microbiol.* **2003**, *48*, 699–702. [[CrossRef](#)]
111. Zhang, M.; Zhang, J.; Li, J.; Wu, X.; Xiao, L.; Liu, X.; Yang, X.; Yang, L.; Zou, Q.; Huang, W. AmpR Increases the Virulence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* by Regulating the Initial Step of Capsule Synthesis. *Infect. Drug Resist.* **2020**, *13*, 3431–3441. [[CrossRef](#)]
112. Bachman, M.A.; Oyler, J.E.; Burns, S.H.; Caza, M.; Lépine, F.; Dozois, C.M.; Weiser, J.N. *Klebsiella Pneumoniae* Yersiniabactin Promotes Respiratory Tract Infection through Evasion of Lipocalin 2. *Infect. Immun.* **2011**, *79*, 3309–3316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Bachman, M.A.; Lenio, S.; Schmidt, L.; Oyler, J.E.; Weiser, J.N. Interaction of Lipocalin 2, Transferrin, and Siderophores Determines the Replicative Niche of *Klebsiella Pneumoniae* during Pneumonia. *mBio* **2012**, *3*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Morinaga, Y.; Take, Y.; Sasaki, D.; Ota, K.; Kaku, N.; Uno, N.; Sakamoto, K.; Kosai, K.; Miyazaki, T.; Hasegawa, H.; et al. Exploring the Microbiota of Upper Respiratory Tract during the Development of Pneumonia in a Mouse Model. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0222589. [[CrossRef](#)]
115. Fagundes, C.T.; Amaral, F.A.; Vieira, A.T.; Soares, A.C.; Pinho, V.; Nicoli, J.R.; Vieira, L.Q.; Teixeira, M.M.; Souza, D.G. Transient TLR Activation Restores Inflammatory Response and Ability to Control Pulmonary Bacterial Infection in Germfree Mice. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 1411–1420. [[CrossRef](#)]
116. Vieira, A.T.; Rocha, V.M.; Tavares, L.; Garcia, C.C.; Teixeira, M.M.; Oliveira, S.C.; Cassali, G.D.; Gamba, C.; Martins, F.S.; Nicoli, J.R. Control of *Klebsiella Pneumoniae* Pulmonary Infection and Immunomodulation by Oral Treatment with the Commensal Probiotic Bifidobacterium Longum 51A. *Microbes Infect.* **2016**, *18*, 180–189. [[CrossRef](#)]
117. van der Weide, H.; Cossio, U.; Gracia, R.; te Welscher, Y.M.; ten Kate, M.T.; van der Meijden, A.; Marradi, M.; Ritsema, J.A.S.; Vermeulen-de Jongh, D.M.C.; Storm, G.; et al. Therapeutic Efficacy of Novel Antimicrobial Peptide AA139-Nanomedicines in a Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Pneumonia-Septicemia Model in Rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e00517-20. [[CrossRef](#)]
118. Chhibber, S.; Wadhwa, S.; Yadav, V. Protective Role of Liposome Incorporated Lipopolysaccharide Antigen of *Klebsiella Pneumoniae* in a Rat Model of Lobar Pneumonia. *Jpn. J. Infect. Dis.* **2004**, *57*, 150–155.
119. Sale, L., Jr.; Wood, W.B., Jr. Studies on the Mechanism of Recovery in Pneumonia Due to Friedländer's Bacillus: I. The Pathogenesis of Experimental Friedländer's Bacillus Pneumonia. *J. Exp. Med.* **1947**, *86*, 239–248. [[CrossRef](#)]

120. Sale, L.; Smith, M.R.; Wood, W.B. Studies on the Mechanism of Recovery in Pneumonia Due to Friedländer's Bacillus: II. The Effect of Sulfonamide Chemotherapy upon the Pulmonary Lesion of Experimental Friedländer's Bacillus Pneumonia. *J. Exp. Med.* **1947**, *86*, 249–256. [[CrossRef](#)]
121. Struve, C.; Bojer, M.; Krogfelt, K.A. Identification of a Conserved Chromosomal Region Encoding *Klebsiella Pneumoniae* Type 1 and Type 3 Fimbriae and Assessment of the Role of Fimbriae in Pathogenicity. *Infect. Immun.* **2009**, *77*, 5016–5024. [[CrossRef](#)]
122. Struve, C.; Krogfelt, K.A. Role of Capsule in *Klebsiella Pneumoniae* Virulence: Lack of Correlation between In Vitro and In Vivo Studies. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *218*, 149–154. [[CrossRef](#)]
123. Camprubi, S.; Merino, S.; Benedi, V.-J.; Tomás, J.M. The Role of the O-Antigen Lipopolysaccharide and Capsule on an Experimental *Klebsiella Pneumoniae* Infection of the Rat Urinary Tract. *FEMS Microbiol. Lett.* **1993**, *111*, 9–13. [[CrossRef](#)]
124. Fader, R.C.; Davis, C.P. Effect of Piliation on *Klebsiella Pneumoniae* Infection in Rat Bladders. *Infect. Immun.* **1980**, *30*, 554–561. [[CrossRef](#)]
125. Maayan, M.C.; Ofek, I.; Medalia, O.; Aronson, M. Population Shift in Mannose-Specific Fimbriated Phase of *Klebsiella Pneumoniae* during Experimental Urinary Tract Infection in Mice. *Infect. Immun.* **1985**, *49*, 785–789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Rosen, D.A.; Pinkner, J.S.; Walker, J.N.; Elam, J.S.; Jones, J.M.; Hultgren, S.J. Molecular Variations in *Klebsiella Pneumoniae* and *Escherichia Coli* FimH Affect Function and Pathogenesis in the Urinary Tract. *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 3346–3356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Rosen, D.A.; Pinkner, J.S.; Jones, J.M.; Walker, J.N.; Clegg, S.; Hultgren, S.J. Utilization of an Intracellular Bacterial Community Pathway in *Klebsiella Pneumoniae* Urinary Tract Infection and the Effects of FimK on Type 1 Pilus Expression. *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 3337–3345. [[CrossRef](#)]
128. Rosen, D.A.; Hung, C.-S.; Kline, K.A.; Hultgren, S.J. Streptozocin-Induced Diabetic Mouse Model of Urinary Tract Infection. *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 4290–4298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Gomes, A.É.L.; Pacheco, T.; da Silva dos Santos, C.; Pereira, J.A.; Ribeiro, M.L.; Darrieux, M.; Ferraz, L.F.C. Functional Insights From Kpfr, a New Transcriptional Regulator of Fimbrial Expression That Is Crucial for *Klebsiella Pneumoniae* Pathogenicity. *Front. Microbiol.* **2021**, *11*, 601921. [[CrossRef](#)]
130. Merino, S.; Altarrriba, M.; Izquierdo, L.; Nogueras, M.M.; Regué, M.; Tomás, J.M. Cloning and Sequencing of the *Klebsiella Pneumoniae* O5wb Gene Cluster and Its Role in Pathogenesis. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 2435–2440. [[CrossRef](#)]
131. Murphy, C.N.; Mortensen, M.S.; Krogfelt, K.A.; Clegg, S. Role of *Klebsiella Pneumoniae* Type 1 and Type 3 Fimbriae in Colonizing Silicone Tubes Implanted into the Bladders of Mice as a Model of Catheter-Associated Urinary Tract Infections. *Infect. Immun.* **2013**, *81*, 3009–3017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Fung, C.-P.; Lin, Y.-T.; Lin, J.-C.; Chen, T.-L.; Yeh, K.-M.; Chang, F.-Y.; Chuang, H.-C.; Wu, H.-S.; Tseng, C.-P.; Siu, L.K. *Klebsiella Pneumoniae* in Gastrointestinal Tract and Pyogenic Liver Abscess. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 1322–1325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Buffie, C.G.; Pamer, E.G. Microbiota-Mediated Colonization Resistance against Intestinal Pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *13*, 790–801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Van der Waaij, D.; Berghuis-de Vries, J.M.; Lekkerkerk-van der Wees, J.E.C. Colonization Resistance of the Digestive Tract in Conventional and Antibiotic-Treated Mice. *Epidemiol. Infect.* **1971**, *69*, 405–411. [[CrossRef](#)]
135. Miller, C.P.; Bohnhoff, M. Changes in the Mouse's Enteric Microflora Associated with Enhanced Susceptibility to *Salmonella* Infection Following Streptomycin Treatment. *J. Infect. Dis.* **1963**, *113*, 59–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Honma, K.; Mishima, E.; Inagaki, S.; Shama, A. The OxyR Homologue in *Tannerella Forsythia* Regulates Expression of Oxidative Stress Responses and Biofilm Formation. *Microbiology* **2009**, *155*, 1912–1922. [[CrossRef](#)]
137. Johnson, J.R.; Clabots, C.; Rosen, H. Effect of Inactivation of the Global Oxidative Stress Regulator OxyR on the Colonization Ability of *Escherichia Coli* O1:K1:H7 in a Mouse Model of Ascending Urinary Tract Infection. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 461–468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Chung, C.-H.; Fen, S.; Yu, S.-C.; Wong, H. Influence of OxyR on Growth, Biofilm Formation, and Mobility of *Vibrio Parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 788–796. [[CrossRef](#)]
139. Sana, T.G.; Flaugnatti, N.; Lugo, K.A.; Lam, L.H.; Jacobson, A.; Baylot, V.; Durand, E.; Journet, L.; Cascales, E.; Monack, D.M. *Salmonella* Typhimurium Utilizes a T6SS-Mediated Antibacterial Weapon to Establish in the Host Gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E5044–E5051. [[CrossRef](#)]
140. Chen, Y.-T.; Chang, H.-Y.; Lai, Y.-C.; Pan, C.-C.; Tsai, S.-F.; Peng, H.-L. Sequencing and Analysis of the Large Virulence Plasmid PLVPK of *Klebsiella Pneumoniae* CG43. *Gene* **2004**, *337*, 189–198. [[CrossRef](#)]
141. Cortés, G.; de Astorza, B.; Benedi, V.J.; Alberti, S. Role of the HtrA Gene in *Klebsiella Pneumoniae* Virulence. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 4772–4776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Athamna, A.; Ofek, I.; Keisari, Y.; Dutton, G.G.S.; Sharon, N. Lectinophagocytosis of Encapsulated *Klebsiella Pneumoniae* Mediated by Surface Lectins of Guinea Pig Alveolar Macrophages and Human Monocyte-Derived Macrophages. *Infect. Immun.* **1991**, *59*, 10. [[CrossRef](#)]
143. Keisari, Y.; Kabha, K.; Nissimov, L.; Schlepper-Schafer, J.; Ofek, I. Phagocyte-Bacteria Interactions. *Adv. Dent. Res.* **1997**, *11*, 43–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Wang, M.; Jeng, K.C.; Ping, L.I. Exogenous Cytokine Modulation or Neutralization of Interleukin-10 Enhance Survival in Lipopolysaccharide-Hyporesponsive C3H/HeJ Mice with *Klebsiella* Infection. *Immunology* **1999**, *98*, 90–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

145. Greenberger, M.J.; Strieter, R.M.; Kunkel, S.L.; Danforth, J.M.; Goodman, R.E.; Standiford, T.J. Neutralization of IL-10 Increases Survival in a Murine Model of *Klebsiella Pneumoniae*. *J. Immunol.* **1995**, *155*, 722–729.
146. Ko, W.-C. Community-Acquired *Klebsiella Pneumoniae* Bacteremia: Global Differences in Clinical Patterns. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 160–166. [[CrossRef](#)]
147. Rello, J.; Rodriguez, R.; Jubert, P.; Alvarez, B.; Study Group for Severe Community-Acquired Pneumonia. Severe Community-Acquired Pneumonia in the Elderly: Epidemiology and Prognosis. *Clin. Infect. Dis.* **1996**, *23*, 723–728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Song, J.-H.; Oh, W.S.; Kang, C.-I.; Chung, D.R.; Peck, K.R.; Ko, K.S.; Yeom, J.S.; Kim, C.K.; Kim, S.W.; Chang, H.-H.; et al. Epidemiology and Clinical Outcomes of Community-Acquired Pneumonia in Adult Patients in Asian Countries: A Prospective Study by the Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2008**, *31*, 107–114. [[CrossRef](#)]
149. Jones, R.N. Microbial Etiologies of Hospital-Acquired Bacterial Pneumonia and Ventilator-Associated Bacterial Pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **2010**, *51*, S81–S87. [[CrossRef](#)]
150. Rammaert, B.; Goyet, S.; Beauté, J.; Hem, S.; Te, V.; Try, P.L.; Mayaud, C.; Borand, L.; Buchy, P.; Guillard, B.; et al. *Klebsiella Pneumoniae* Related Community-Acquired Acute Lower Respiratory Infections in Cambodia: Clinical Characteristics and Treatment. *BMC Infect. Dis.* **2012**, *12*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Percival, S.L.; Suleman, L.; Vuotto, C.; Donelli, G. Healthcare-Associated Infections, Medical Devices and Biofilms: Risk, Tolerance and Control. *J. Med. Microbiol.* **2015**, *64*, 323–334. [[CrossRef](#)]
152. Mizgerd, J.P.; Skerrett, S.J. Animal Models of Human Pneumonia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2008**, *294*, L387–L398. [[CrossRef](#)]
153. Bielen, K.; 'S Jongers, B.; Malhotra-Kumar, S.; Jorens, P.G.; Goossens, H.; Kumar-Singh, S. Animal Models of Hospital-Acquired Pneumonia: Current Practices and Future Perspectives. *Ann. Transl. Med.* **2017**, *5*, 132. [[CrossRef](#)]
154. Dickson, R.P.; Erb-Downward, J.R.; Falkowski, N.R.; Hunter, E.M.; Ashley, S.L.; Huffnagle, G.B. The Lung Microbiota of Healthy Mice Are Highly Variable, Cluster by Environment, and Reflect Variation in Baseline Lung Innate Immunity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2018**, *198*, 497–508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Dumas, A.; Bernard, L.; Poquet, Y.; Lugo-Villarino, G.; Neyrolles, O. The Role of the Lung Microbiota and the Gut–Lung Axis in Respiratory Infectious Diseases. *Cell. Microbiol.* **2018**, *20*, e12966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Flores-Mireles, A.L.; Walker, J.N.; Caparon, M.; Hultgren, S.J. Urinary Tract Infections: Epidemiology, Mechanisms of Infection and Treatment Options. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 269–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Clegg, S.; Murphy, C.N. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella Pneumoniae*. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Langermann, S.; Möllby, R.; Burlein, J.E.; Palaszynski, S.R.; Gale Auguste, C.; DeFusco, A.; Strouse, R.; Schenerman, M.A.; Hultgren, S.J.; Pinkner, J.S.; et al. Vaccination with FimH Adhesin Protects Cynomolgus Monkeys from Colonization and Infection by Uropathogenic *Eschevichia Coli*. *J. Infect. Dis.* **2000**, *181*, 774–778. [[CrossRef](#)]
159. Livrelli, V.; De Champs, C.; Di Martino, P.; Darfeuille-Michaud, A.; Forestier, C.; Joly, B. Adhesive Properties and Antibiotic Resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia* Clinical Isolates Involved in Nosocomial Infections. *J. Clin. Microbiol.* **1996**, *34*, 1963–1969. [[CrossRef](#)]
160. Panthier, J.-J.; Montagutelli, X. Le Collaborative Cross—Un outil révolutionnaire à l’assaut des caractères complexes. *Med. Sci.* **2012**, *28*, 103–108. [[CrossRef](#)]

Annexe n°2

npj | Biofilms and Microbiomes

[www.nature.com/npjbiofilms](http://www.nature.com/npjbiofilms)

ARTICLE OPEN

## Colonization and immune modulation properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilm-dispersed cells

Cyril Guilhen<sup>1,3</sup>, Sylvie Miquel<sup>1</sup>, Nicolas Charbonnel<sup>1</sup>, Laura Joseph<sup>1</sup>, Guillaume Carrier<sup>1,2,4</sup>, Christiane Forestier<sup>1</sup> and Damien Balestrino<sup>1</sup>

## ARTICLE OPEN

Colonization and immune modulation properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilm-dispersed cellsCyril Guilhen<sup>1,3</sup>, Sylvie Miquel<sup>1</sup>, Nicolas Charbonnel<sup>1</sup>, Laura Joseph<sup>1</sup>, Guillaume Carrier<sup>1,2,4</sup>, Christiane Forestier<sup>1</sup> and Damien Balestrino<sup>1</sup>

Biofilm-dispersal is a key determinant for further dissemination of biofilm-embedded bacteria. Recent evidence indicates that biofilm-dispersed bacteria have transcriptional features different from those of both biofilm and planktonic bacteria. In this study, the *in vitro* and *in vivo* phenotypic properties of *Klebsiella pneumoniae* cells spontaneously dispersed from biofilm were compared with those of planktonic and sessile cells. Biofilm-dispersed cells, whose growth rate was the same as that of exponential planktonic bacteria but significantly higher than those of sessile and stationary planktonic forms, colonized both abiotic and biotic surfaces more efficiently than their planktonic counterparts regardless of their initial adhesion capabilities. Microscopy studies suggested that dispersed bacteria initiate formation of microcolonies more rapidly than planktonic bacteria. In addition, dispersed cells have both a higher engulfment rate and better survival/multiplication inside macrophages than planktonic cells and sessile cells. In an *in vivo* murine pneumonia model, the bacterial load in mice lungs infected with biofilm-dispersed bacteria was similar at 6, 24 and 48 h after infection to that of mice lungs infected with planktonic or sessile bacteria. However, biofilm-dispersed and sessile bacteria trend to elicit innate immune response in lungs to a lesser extent than planktonic bacteria. Collectively, the findings from this study suggest that the greater ability of *K. pneumoniae* biofilm-dispersed cells to efficiently achieve surface colonization and to subvert the host immune response confers them substantial advantages in the first steps of the infection process over planktonic bacteria.

npj Biofilms and Microbiomes (2019)5:25

; <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0098-1>

## INTRODUCTION

*Klebsiella pneumoniae* is an opportunist pathogen ubiquitous in nature and found asymptotically in more than 40% of the population.<sup>1</sup> It has been identified as a direct menace for human health owing to its capacity to resist many antibiotics,<sup>2–4</sup> and its pivotal role in the initial acquisition and spreading of antibiotic-resistant genes.<sup>5</sup> The high ability of *K. pneumoniae* to form biofilm and thus to colonize tissues and medical devices is also a main factor contributing to the development of healthcare-associated infections.<sup>6,7</sup> The formation of biofilms on respiratory devices can lead to pneumonia via bacterial dissemination in the lower respiratory tract,<sup>8,9</sup> with *K. pneumoniae* being responsible for 9.8% of ventilator-associated pneumonia (VAP) cases in intensive care units.<sup>10</sup>

The development of biofilms, i.e., surface-attached bacteria encased in a self-generated matrix,<sup>11</sup> is classically described as a sequential process involving adhesion of bacteria to the surface, formation of microcolonies, maturation by synthesis of an exopolymeric matrix, and finally dispersal.<sup>12</sup> Dispersal involves the sensing of signals and their transduction through complex regulatory pathways. It is the necessary step that allows bacteria to leave the biofilm macrostructure as free-living cells able to colonize new locations, hence its prominent role in biofilm-related infections.<sup>13–15</sup> For instance, *Staphylococcus epidermidis* mutants deficient in dispersal effectors are less virulent because unable to promote their systemic dissemination from the indwelling device

in a mouse model.<sup>16</sup> Likewise, *in vivo* dispersal of *P. aeruginosa* biofilm induced by enzymatic agents causes lethal septicemia in a mouse wound model.<sup>17</sup>

Biofilm-dispersed bacteria have long been described as planktonic cells, but a few studies have shown that they possess specific properties. Several recent transcriptional analyses showed that biofilm-dispersed bacteria exhibit specific patterns, distinct from planktonic and sessile lifestyles.<sup>18–20</sup> A few phenotypic analyses have also shown that they have specific characteristics different from those of planktonic bacteria, such as the over-expression of virulence factors.<sup>18,19,21–23</sup> For example, *P. aeruginosa* and *S. pneumoniae* biofilm-dispersed bacteria kill epithelial and macrophage cells lines more effectively and have greater virulence in *in vivo* models than their planktonic counterparts.<sup>18,19,21</sup> However, apart from these few cases, little is known about the properties of biofilm-dispersed cells. This is partly due to the technical difficulties encountered in harvesting biofilm-dispersed bacteria. For this reason, most studies used signals as inducers of biofilm dispersal.<sup>24,25</sup> For instance, an increase in temperature causes dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilm,<sup>26,27</sup> and a decrease in cellular c-di-GMP concentration obtained by a chemical or enzymatic approach has been used to disperse *P. aeruginosa* biofilm.<sup>24,25</sup>

In this work, we assessed the intrinsic characteristics of *K. pneumoniae* cells spontaneously dispersed from mature biofilm, concentrating on their metabolic activity and colonization capabilities, and the host-induced immune responses compared

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, CNRS 6023, LMGE, Clermont-Ferrand, France; <sup>2</sup>Université Clermont Auvergne, Inserm U1071, USC-INRA 2018, M2ISH, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France; <sup>3</sup>Present address: Université de Genève, Centre Médical Universitaire, Département de Physiologie Cellulaire et Métabolisme, Genève, Suisse and <sup>4</sup>Present address: Department of Surgical Oncology, Institut du Cancer de Montpellier, Montpellier, France  
Correspondence: Damien Balestrino (damien.balestrino@uca.fr)

Received: 2 October 2018 Accepted: 12 August 2019

Published online: 24 September 2019

to those of their sessile and planktonic counterparts. We were able to show that biofilm-dispersed bacteria are predisposed to efficiently colonize new surfaces and to potentially impair host response.

## RESULTS

*K. pneumoniae* biofilm-dispersed bacteria have specific physiology

To assess the metabolic state of biofilm-dispersed cells, we looked at the expression level of the 205 CDS previously annotated in the Clusters of Orthologous Groups (COGs) "Translation, ribosomal structure and biogenesis".<sup>20</sup> A large number of them [156] were overexpressed (Z-score > 0) in biofilm-dispersed bacteria compared to planktonic and sessile growth conditions (Fig. 1a). In addition, dispersed bacteria had a growth rate and intracellular pool of ATP similar to those of exponential planktonic cells but significantly higher than those of sessile and stationary planktonic forms, supporting the idea that dispersed cells are particularly metabolically active. Sessile bacteria had the lowest ATP content of all the conditions tested (Fig. 1b, c). Although biofilm-dispersed bacteria had a metabolic activity different from that of sessile bacteria, scanning electron microscopy (SEM) observations showed that biofilm-dispersed and sessile bacteria had an altered morphology and, unlike planktonic cells, were covered by extracellular material (Fig. 2).

*K. pneumoniae* biofilm-dispersed bacteria are highly efficient in colonizing abiotic and biotic surfaces

To assess whether *K. pneumoniae* biofilm-dispersed bacteria have different adhesion and colonization abilities from those of planktonic bacteria despite their similarities in terms of metabolic activity, we measured the biomass present on a glass surface after 3 h of incubation. Biofilm-dispersed bacteria generated more biomass than planktonic cells (Fig. 3a, right panel). When the assay was performed in the presence of chloramphenicol, a bacteriostatic antibiotic inhibiting de novo protein synthesis, the bacteria had similar adhesion levels irrespective of their initial lifestyle (Fig. 3a, left panel). Analysis of the kinetics of surface colonization by real-time confocal imaging showed that biofilm-dispersed cells generated significantly higher biomass than planktonic cells as early as after 100 min of incubation (Fig. 3b).

To follow the clonal expansion of bacteria during the 3 h initial step of surface coverage, the surface was seeded with two clones of a given lifestyle, planktonic or biofilm-dispersed, tagged with different fluorochromes, either GFP or mCherry. Biofilm-dispersed bacteria formed large microcolonies after 3 h of incubation, whereas planktonic cells formed small microcolonies with lower density surface coverage (Fig. 3c). The nature of the fluorescent protein expressed had no impact on the bacterial kinetics of colonization (Supplementary Fig. 1).

Colonization experiments were also conducted with mixed populations formed with similar inocula of differentially-tagged biofilm-dispersed and planktonic bacteria. CFU quantification of the biomass formed on the glass surface after 3 h of incubation showed that biofilm-dispersed bacteria generated a greater biomass than their planktonic counterparts (Fig. 3d). This difference could not be attributed to autoaggregation properties of the bacteria since both biofilm-dispersed and planktonic bacteria had the same low kinetics of sedimentation in static tube assay (Supplementary Fig. 2). Moreover, flow cytometry analysis of sonicated biofilm-dispersed bacteria showed no differences in size and structure from those of the non-sonicated samples, suggesting that biofilm-dispersed bacteria did not comprise aggregates (Supplementary Fig. 3).

In mixed biofilm, the analysis of the kinetics of surface colonization showed that the biomass from the biofilm-

dispersed bacteria outcompeted rapidly that from their planktonic counterparts due to rapid formation of microcolonies (Fig. 3e, f and Supplementary Movie 1). In addition, the number of free-living bacteria in the supernatant of a biofilm derived from biofilm-dispersed cells was lower than that of biofilm derived from planktonic bacteria incubated under the same conditions (Fig. 3d). This result suggests that biofilm-dispersed bacteria stick together and onto the substratum while they multiply whereas planktonic bacteria are released in the supernatant and do not colonize the surface as efficiently.

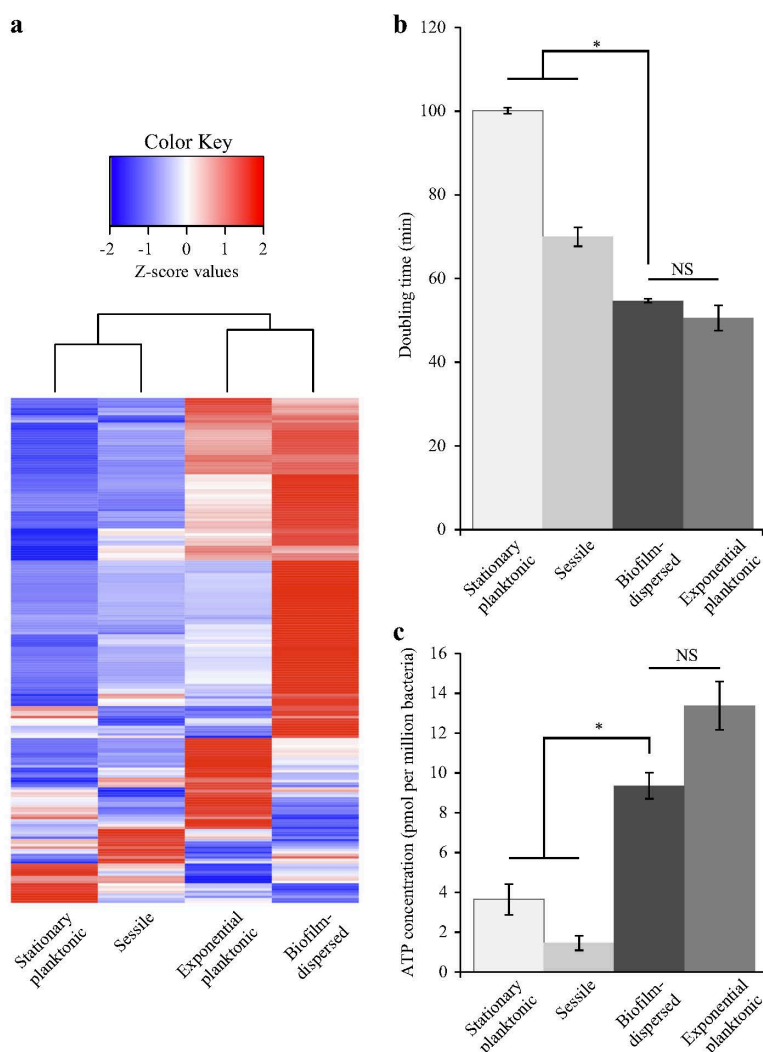
In line with the previous observations on an abiotic surface, bacterial adhesion to pharyngeal (FaDu) and lung (A549) epithelial cells measured in the presence of chloramphenicol was similar for biofilm-dispersed and planktonic bacteria. However, bacteria derived from biofilm-dispersed cells had significantly higher colonization capacities of the cell lawn than their planktonic counterparts (Fig. 4). Altogether, these results suggest that biofilm-dispersed bacteria have intrinsic predispositions to colonize biotic and abiotic surfaces.

Sessile and biofilm-dispersed *K. pneumoniae* cells induce an attenuated host response compared to planktonic cells

The assessment of engulfment within macrophages showed that the internalization of biofilm-dispersed cells by J774A.1 murine macrophages was higher than that of planktonic and sessile bacteria (Fig. 5a). The percentage of alive-bacteria relative to engulfed bacteria after 24 h of incubation, which is the result of both bacterial death and bacterial multiplication, was significantly higher for biofilm-dispersed cells than for planktonic and sessile bacteria (Fig. 5b).

In a murine model of lung colonization, similar numbers of viable *K. pneumoniae* were detected in the lungs of mice 6, 24 and 48 h after intra-nasal instillation of either planktonic, sessile or biofilm-dispersed cells (Fig. 6a). No bacteria were detected in spleen for any group of animals whatever the time point of infection. After weighing of the animals, it was observed that all groups of mice receiving bacteria had a significant loss of weight at 24 h time point after inoculation compared to the control group treated with PBS (Fig. 6b). However, 48 h after inoculation, the difference was not statistically significant in the group of animals inoculated with sessile bacteria (Fig. 6b). To assess the innate host inflammatory response to infection, IL-6, IL-1 $\beta$ , KC, TNF- $\alpha$ , and IL-10 levels were measured in lung and spleen homogenates, and in the blood. No detectable level of these cytokines was measured in blood samples of the animals. Whatever the bacterial lifestyle, i.e., planktonic, sessile or biofilm-dispersed, *K. pneumoniae* induced production of the pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-1 $\beta$ , and KC in the lungs as early as 6 h post-infection. The levels of these cytokines in the lungs at 6 h time point after inoculation were higher than those measured after 24 h and 48 h of infection (Fig. 6c-e). The levels of these pro-inflammatory cytokines in infected animals were always maintained significantly higher than those measured in the non-infected mice during the 48 h period of the assays (Fig. 6c-e), except for the IL-1 $\beta$  and KC levels in mice infected with biofilm-dispersed bacteria which were not significantly different than those of the non-infected mice at the 24 h time point after infection (Fig. 6b). Moreover, the pro-inflammatory response was less extensive with sessile bacteria than with planktonic bacteria at 48 h post-infection (Fig. 6e). At this time point, all animals infected with sessile *K. pneumoniae* had a significant lower production of TNF- $\alpha$  and IL-10 in the lungs than those infected with planktonic bacteria (Fig. 6e). The biofilm-dispersed bacteria induced an intermediary immune response compared to those induced by planktonic or sessile bacteria, lower than that induced by planktonic bacteria and higher than that induced by sessile bacteria (Fig. 6c-e).



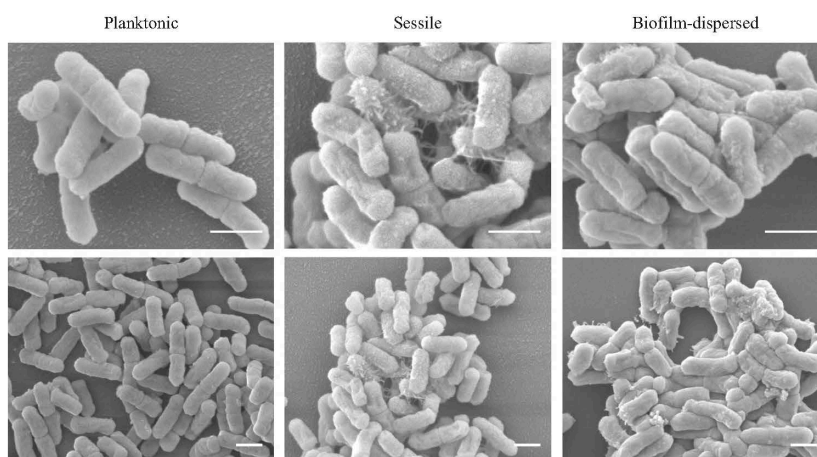


**Fig. 1** *K. pneumoniae* biofilm-dispersed bacteria have elevated metabolic activity. **a** Heatmap depicting the expression values of the 205 CDS annotated in the COG “Translation, ribosomal structure and biogenesis”. Z-score values, obtained from a published transcriptomic study,<sup>20</sup> were clustered as columns with hierarchical clustering. **b** Bacteria from the different bacterial states were cultured in fresh medium and the doubling time was obtained on the basis of the slope calculated in accordance with the growth curve of the first hour of culture. Values represent mean  $\pm$  s.e.m ( $n = 3$ ). **c** Intracellular ATP concentration was monitored in the different bacterial states and normalized by determination of the CFU number. Values represent mean  $\pm$  s.e.m. ( $n = 3$ )

In spleen, no cytokine response was observed, except for the pro-inflammatory marker KC that was significantly increased at the 48 h time point in the groups of mice inoculated with planktonic and biofilm-dispersed bacteria compared to the control group (Fig. 6f–h). Although significant, the increase of KC level in mice infected with biofilm-dispersed bacteria was lower than that of mice infected with planktonic bacteria (Fig. 6h). The TNF- $\alpha$ /IL-10 ratios were not significantly changed regardless of the organ, the bacteria lifestyle and the time point post-inoculation, except in the spleen of mice infected with sessile bacteria where they were significantly lower than in non-infected mice at 24 h time point after infection (Supplementary Fig. 4).

## DISCUSSION

Biofilm dispersal is a critical step in the colonization of new environmental niches. It is particularly problematic in medicine since it is involved in the development of systemic infections by promoting the transition from biofilm colonization to dissemination and invasive disease.<sup>15,16</sup> Dispersal can be triggered by host signals, as observed in the pathophysiology of secondary pneumonia due to *Streptococcus pneumoniae* and *S. aureus*, or can be considered as the normal physiology of biofilm when intrinsically induced.<sup>15,21,26</sup> Disseminated bacteria encounter various potentially stressful environments such as the host immune system and antimicrobial agents and have probably



**Fig. 2** Scanning electron microscopy (SEM) observations of *K. pneumoniae* planktonic and biofilm-dispersed bacteria. Magnifications:  $\times 200,000$  upper pictures,  $\times 10,000$  lower pictures. Scale bar:  $1\ \mu\text{m}$ . The images are representative of the general morphology observed in each case

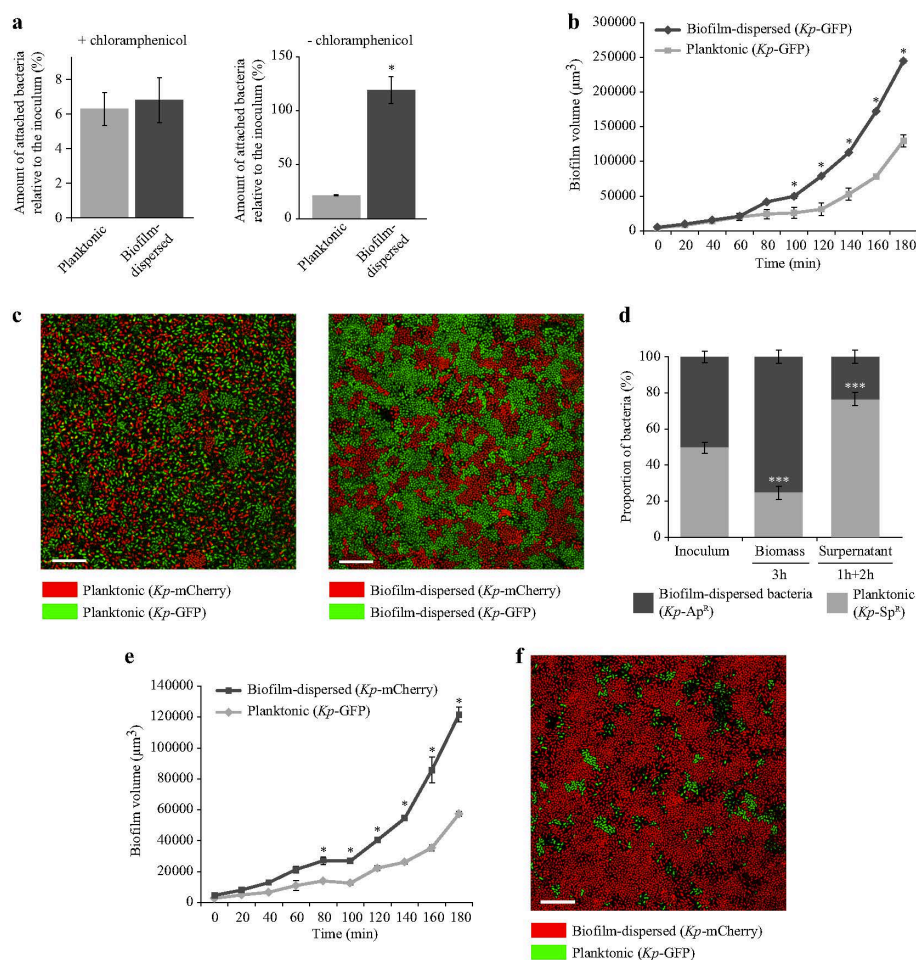
developed strategies to escape from or fight against these threats.<sup>15</sup> Several studies, especially transcriptomic analyses, have suggested that biofilm-dispersed cells have a specific phenotype, different from that of planktonic and sessile bacteria.<sup>18–23</sup> In this study, we investigated the colonization abilities of *K. pneumoniae* biofilm-dispersed cells in different models and their interactions with the host immune system.

Data from our study showed that *K. pneumoniae* biofilm-dispersed bacteria had enhanced colonization capabilities, i.e., adhesion coupled with bacterial multiplication on a substratum, on both biotic and abiotic surfaces. These properties could be due to high metabolic activity but *K. pneumoniae* dispersed bacteria had growth and ATP content similar to those of planktonic bacteria, as previously observed with *S. pneumoniae*.<sup>18</sup> A second hypothesis would be that *K. pneumoniae* biofilm-dispersed cells possess specific physico-chemical surface properties that enable the cells to rapidly adhere to the substrates. Berlanga et al.<sup>28</sup> recently showed that the surface of *Klebsiella oxytoca* biofilm-dispersed cells was more hydrophobic than that of their planktonic counterparts, thereby facilitating adhesion to polystyrene and the biofilm formation process on similar surfaces. In our study, the initial adhesion capabilities of the *K. pneumoniae* biofilm-dispersed cells were similar to those of their planktonic counterparts, suggesting that no adhesin was specifically exposed at the surface of biofilm-dispersed bacteria, and there was no difference in their surface physicochemical properties as assessed by microbial affinity to solvents (MATS) test (Supplementary Table 1). A third hypothesis is that dispersed cells consist of small aggregates, which would thus accelerate the process of colonization, as described with *P. aeruginosa*.<sup>29,30</sup> However, in our study the *K. pneumoniae* dispersal population had no multicellular aggregates, the autoaggregation phenotype was similar in biofilm-dispersed and planktonic lifestyles (Supplementary Fig. 2) and disruption of the potential aggregates by sonication had no impact on the colonization capabilities of biofilm-dispersed bacteria (Supplementary Fig. 5). The efficient ability of *K. pneumoniae* dispersed cells to colonize new surfaces would therefore be due to a specific capacity of such cells to rapidly form microcolonies, as observed by microscopic examination. The presence of potential residues at the surface of dispersed bacteria (Fig. 2) may enhance the formation of microcolonies thereby promoting biofilm formation and giving them a selective advantage over planktonic cells (Fig. 3e, f). Since efficient surface

colonization by biofilm-dispersed bacteria requires protein de novo biosynthesis, we can assume that dispersed bacteria do not have specific adhesins overexpressed on the bacterial surface when they leave the biofilm biomass. The initial colonization step would be ensured by rapidly synthesized components, such as matrix components or adhesins. Accordingly, previous transcriptional analyses showed that several operons involved in colonization and biofilm formation, such as the *kpg* and *kpj* operons, are overexpressed in biofilm-dispersed bacteria compared to planktonic bacteria.<sup>20,31</sup>

*K. pneumoniae* biofilm-dispersed cells could also possess specific properties that enable them to escape the immune system during interactions with the host defenses. However, *K. pneumoniae* biofilm-dispersed bacteria were phagocytosed at a higher level than planktonic bacteria, unlike *P. aeruginosa* biofilm-dispersed bacteria, which have a greater ability to escape from engulfment by macrophages than their planktonic counterparts.<sup>19</sup> *K. pneumoniae* expresses capsule on its surface, which impairs phagocytosis.<sup>32</sup> However, RNA sequencing data showed that the expression of the capsule-encoding genes is similar in *K. pneumoniae* planktonic and biofilm-dispersed bacteria<sup>20</sup> and therefore cannot account for the modulation of engulfment of biofilm-dispersed cells by macrophages. It cannot be excluded however that capsule shedding is different between the populations and may explain the differences in uptake. Moreover, the enhanced engulfment of biofilm-dispersed bacteria could be due to other mechanisms, such as the interaction of bacterial moieties specifically expressed by biofilm-dispersed bacteria with specific macrophage receptors. In contrast, the *K. pneumoniae* sessile population, consisting of individualized bacteria, showed a level of phagocytosis not significantly different from that of planktonic bacteria. Likewise, *S. epidermidis* singularized sessile bacteria were taken up by J774A.1 macrophages as efficiently as the free-living form, whereas the biofilm organization impaired phagocytosis.<sup>33</sup>

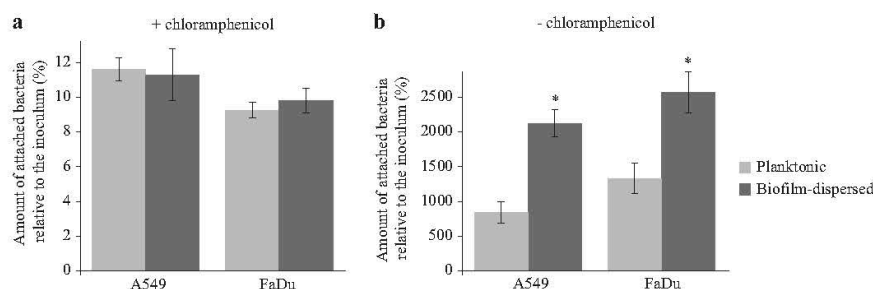
In our study, biofilm-dispersed bacteria were recovered at a higher level than planktonic and sessile bacteria after 24 h of incubation in macrophages owing to a higher resistance to bactericidal activity after uptake and/or a higher multiplication rate inside phagocytes. Cano et al.<sup>34</sup> reported that *K. pneumoniae* is able to interfere with phagosome maturation by avoiding fusion with lysosomes. The pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) of microbes engulfed within macrophages can influence,



**Fig. 3** *K. pneumoniae* biofilm-dispersed bacteria efficiently colonize abiotic surfaces and outcompete the planktonic bacteria during surface colonization. **a** The initial adhesion to glass was assessed in the presence of chloramphenicol, which inhibits de novo protein synthesis; left panel. The glass surface colonization was assessed in the absence of chloramphenicol; right panel. Results are presented as the percentages of adherent bacteria after 3 h of incubation compared to the CFU in the inoculum. **b** The kinetics of colonization of the glass surface by *Kp*-GFP was monitored by confocal microscopy. Biofilm volumes were calculated with IMARIS software and are represented in  $\mu\text{m}^3$ . **c** Surface colonization by clonal division of the bacteria was visualized by confocal microscopy after 3 h of inoculation. The surface was seeded with two clones of a given lifestyle, i.e., planktonic or biofilm-dispersed, tagged with different fluorochromes (GFP or mCherry). Images represent the first optical section of the z-stack from the surface after 3 h of incubation. **d** The ability of bacteria to colonize the glass substrate was assessed in a context of competition (biofilm-dispersed bacteria versus planktonic bacteria) and determined by CFU counting of the biomass adhering to the surface after 3 h of incubation. The numbers of free-living bacteria were determined by CFU counting in the supernatant of a 1h-old biofilm, formed by inoculation of equal numbers of biofilm-dispersed (ampicillin resistant) and planktonic bacteria (spectinomycin resistant), further incubated for 2 h. **e** The kinetics of colonization of the glass surface in a context of competition (biofilm-dispersed bacteria versus planktonic bacteria) was monitored by confocal microscopy. Cells derived from biofilm-dispersed and planktonic bacteria were distinguished by their specific fluorescent color. Biofilm volumes were calculated with IMARIS software and are represented in  $\mu\text{m}^3$ . **f** Confocal microscopy observations of the surface coverage by bacteria in a context of competition after 3 h of incubation. The surface was seeded with planktonic and biofilm-dispersed bacteria tagged with GFP and mCherry respectively. Images represent the first optical section of the z-stack from the surface. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ . Values represent mean  $\pm$  s.e.m. ( $n = 3$ ). Statistics: non-parametric Mann-Whitney test: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

positively or negatively, the kinetics of phagosome maturation (for review see ref. <sup>35</sup>). The presence of specific residues at the surface of *K. pneumoniae* biofilm-dispersed bacteria could impair phagosome maturation to a greater extent than with planktonic cells. Nor can we exclude the possibility that *K. pneumoniae* biofilm-dispersed bacteria are able to counteract intracellular intoxication by phagosome products. The high copper content of macrophage phagolysosomes plays an important part in toxicity against several

pathogens (for review see ref. <sup>36</sup>) and some of them are equipped with a battery of copper detoxification defenses. Interestingly, in *K. pneumoniae* biofilm-dispersed bacteria, the two *cusABFC* operons related to copper efflux are overexpressed (in one of them more than 100-fold) compared to their levels of expression in planktonic bacteria.<sup>20</sup> Future studies are warranted to assess the underlying mechanisms that allow *K. pneumoniae* dispersed bacteria to efficiently survive in macrophages.



**Fig. 4** *K. pneumoniae* biofilm-dispersed bacteria efficiently colonize biotic surfaces. **a** The initial adhesion to A549 lung and to FaDu pharyngeal epithelial cells was assessed in the presence of chloramphenicol by CFU determination of adherent bacteria to the monolayers after 3 h of incubation. Results are presented as the percentages of cell-associated bacteria compared to the inoculum. **b** The bacterial colonization of cell monolayers was assessed after 3 h of incubation in the absence of chloramphenicol by CFU counting. Results are presented as the percentages of cell-associated bacteria compared to the inoculum. Each value is the mean of three independent experiments. Values represent mean  $\pm$  s.e.m. ( $n = 3$ ). Statistics: non-parametric Mann-Whitney test: \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$

Several studies have also reported the pathogenicity of biofilm-dispersed bacteria in animal models. For instance, intraperitoneal inoculation of biofilm-dispersed pneumococcal cells in a murine septicemia model showed that they were more virulent than their planktonic and sessile counterparts.<sup>18</sup> To better characterize the behavior in vivo of *K. pneumoniae* spontaneously biofilm-dispersed bacteria, we assessed their virulence in an integrative model of murine pneumonia by measuring the lung colonization and the cytokine response in the lungs and spleen. No significant difference was observed in the number of bacteria recovered at the different time-points post-infection in the animals' lung tissues inoculated with either sessile, biofilm-dispersed bacteria or their planktonic counterparts. Surprisingly, no bacteria were recovered in the spleen, whatever the times point of infection, contrary to previous studies showing bacterial dissemination from lungs.<sup>37,38</sup> The levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , KC, and IL-6 detected in the lungs of infected animals were higher than in the non-infected animals. At the 48 h time point, an increased production of the pro-inflammatory TNF- $\alpha$  was observed only in animals infected by planktonic bacteria, suggesting a lower elicitation of the innate immune system by sessile and biofilm-dispersed bacteria. This finding is of particularly interest since biofilm-dispersed bacteria are those probably able to migrate during *K. pneumoniae* pulmonary infection. The lower elicitation of the immune system by sessile and biofilm-dispersed bacteria is however unlikely to impact the bacterial burden in lungs, at least in our model as demonstrated by measurement of the bacterial loads.

Although no study has previously analyzed the host response to biofilm-dispersed bacteria, the sessile phenotype has already been shown to accentuate the anti-inflammatory response induced by some bacterial species, especially *Lactobacillus*.<sup>39</sup> However, the immune response triggered by biofilms is complex since biofilms can both suppress and overstimulate the immune system, depending on the immune status of the host or the bacterial species composition of the biofilm.<sup>40</sup>

Although *Klebsiella* can counteract the activation of inflammatory responses by attenuating pro-inflammatory IL-1 $\beta$ -induced IL-8 expression,<sup>41,42</sup> it usually induces the production of pro-inflammatory cytokines in such murine lung infection models.<sup>37,41</sup> Siderophore production has recently been described as a major trigger of inflammation and bacterial dissemination during lung infection.<sup>37</sup> Interestingly, the expression of all siderophores encoding genes, including those encoding yersiniabactin, enterobactin, salmochelin and aerobactin, are greatly diminished (up to more than 1000-fold for the yersiniabactin *ybtPQXS* genes encoding the transport system) in *K. pneumoniae* biofilm-dispersed and sessile cells compared to planktonic cells.<sup>20</sup> This

suggests that biofilm-dispersed and sessile bacteria down-regulate siderophore expression to hide from the immune system and avoid a strong proinflammatory response.

Several studies have shown that biofilm-dispersed bacteria had greater pathogenicity than their planktonic counterparts.<sup>15</sup> Our results are in agreement with the notion that *K. pneumoniae* biofilm-dispersed bacteria, like sessile bacteria, tend to elicit a lower inflammation than planktonic bacteria, an essential property for pathogen survival during infection. In addition, biofilm-dispersed bacteria have metabolic activity as high as that of planktonic free-living bacteria, but a greater ability to colonize surfaces. Our results are consistent with the notion that *K. pneumoniae* biofilm-dispersed bacteria could have a potential advantage in the initial step of the infection process. Hence, therapies aiming to disrupt biofilms by promoting their dispersal warrant careful consideration. A thorough understanding of the physiology of biofilm-dispersed bacteria is essential to develop new strategies combining the use of a dispersal signal and antibacterial agents that target potential weaknesses of biofilm-dispersed bacteria.

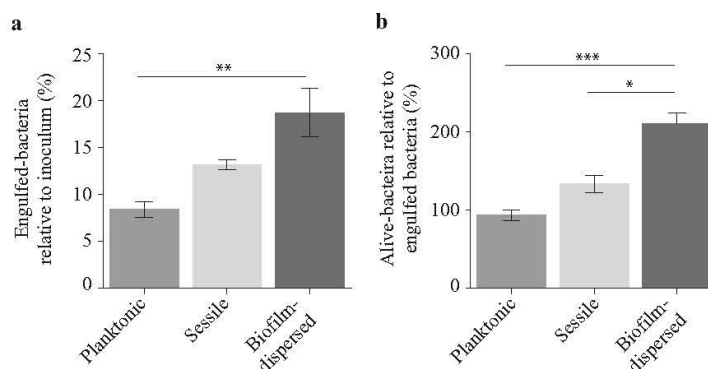
## METHODS

### Bacterial strains, plasmids, and culture conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are given in Table 1. *K. pneumoniae* strains were grown in 0.4% glucose M63B1 minimal medium (M63B1) at 37 °C and stored in Lysogeny Broth (LB) broth containing 15% glycerol at -80 °C. Planktonic bacteria were cultured under aerobic conditions and harvested at  $OD_{620} = 0.8$  (exponential phase of growth) or after overnight growth (stationary phase of growth). Sessile and biofilm-dispersed bacteria were harvested from a flow-cell device as described in detail in.<sup>20</sup> Briefly, a glass cover slip ensuring a surface for biofilm development was glued with silicon glue (3M, Saint Paul, Minnesota, USA) on a flow-cell with one chamber (dimension: 54 mm  $\times$  19 mm  $\times$  6 mm; 6156 mm<sup>3</sup>). Before experiments, the system was sterilized by pumping 10% (wt/vol) hypochlorite sodium for 1 h and then ethanol 100% (vol/vol) for 15 min. Thereafter, the system was rinsed with a continuous flow of M63B1 medium for 2 h at 37 °C. The inoculum, composed of  $10^8$  CFU from an overnight culture of *K. pneumoniae*, was injected with a syringe into the flow-cell. After 1 h of incubation at 37 °C without flow to allow bacterial adhesion, M63B1 medium was pumped at a constant rate of 0.9 mL/min through the device. Sessile and biofilm-dispersed bacteria were recovered after 16 h of culture in the flow-cell or its effluent, respectively. The sessile bacteria were prepared by disrupting the biofilm by vortex; no cell clumps were detected by optical microscopy. All samples were kept on ice until use.

### Construction of *K. pneumoniae*-tagged strains

Strain *Kp-Sp<sup>R</sup>* was constructed by replacing the *shv-1*  $\beta$ -lactamase-encoding gene (chromosomal ampicillin resistance gene) by *aadA7*



**Fig. 5** *K. pneumoniae* biofilm-dispersed bacteria display higher engulfment rates by J774A.1 murine macrophages than that of planktonic cells, and a higher survival/multiplication rate than both planktonic and sessile bacteria. **a** Bacterial engulfment by macrophages is expressed as the number of intracellular bacteria at 1 h post-infection relative to the bacterial number in the inoculum. **b** Bacterial survival/multiplication is expressed as the number of intracellular bacteria at 24 h post-infection relative to that obtained after 1 h post-infection. Values represent mean  $\pm$  s.e.m. ( $n = 3$ ). Statistics: non-parametric Mann–Whitney test: \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$

(spectinomycin resistance) in strain *Kp-Ap*<sup>R,43,44</sup>. The strategy was to replace the chromosomal sequence with a PCR fragment containing the spectinomycin resistance *aadA7* gene amplified from *K. pneumoniae* LM21-GFP-*Sp*<sup>R</sup> chromosomal DNA. *Kp-Sp*<sup>R</sup> was then tagged by insertion of GFP- or mCherry-encoding genes on the chromosome using a mobilizable mini-Tn7 base vector.<sup>45</sup> Briefly, the *gfpmut3* gene amplified from *K. pneumoniae* LM21-GFP-*Sp*<sup>R</sup> genomic DNA, and the codon optimized *mcherry* gene synthetically synthesized (GeneCust, Luxembourg) were cloned under the control of the constitutive  $\lambda p_R$  promoter in the plasmid pUC18R6KT-mini-Tn7T-Km,<sup>45</sup> generating pUC18R6KT-mini-Tn7T-Km-*gfp* and pUC18R6KT-mini-Tn7T-Km-*mcherry* plasmids, respectively. Mini-Tn7 delivery was accomplished by three parental matings involving *E. coli* MFDpir<sup>46</sup> harboring the respective mini-Tn7 delivery plasmid, the *K. pneumoniae* recipient strain, and *E. coli* MFDpir/pTNS3 encoding the *tnsABCD* genes necessary for the transposition of mini-Tn7 at the *attTn7* insertion site.<sup>47</sup>

#### Cell lines and culture conditions

The cell lines used in this study were maintained in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C in the culture medium recommended by ATCC. Human epithelial lung A549 cells (ATCC, CCL-185) and murine macrophages J774A.1 (ATCC, TIB-67) were cultured in DMEM high glucose medium (Dominique Dutscher, Brumath, France) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (Dominique Dutscher). Human pharyngeal epithelial FaDu cells (ATCC, HTB-43) were cultured in MEM medium (Dominique Dutscher) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum.

#### Quantification of intracellular ATP by enzymatic assay

Intracellular ATP concentrations were determined with planktonic, sessile and biofilm-dispersed *Kp-Sp*<sup>R</sup> using the ATP determination kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, bacteria were washed in PBS and approximately 5.10<sup>7</sup> colony-forming units (CFU) were lysed by sonication (10 min – cycles of 30 s ON and 30 s OFF) (Bioruptor® – Diagenode, Liege, Belgium) in the presence of 0.5% Triton X-100 (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Cellular extracts were centrifuged at 10,000  $\times g$  for 1 min, and supernatants were harvested and kept on ice until ATP quantification. In parallel, the initial bacterial load of each sample was quantified by CFU counting to determine the ATP load per bacterial cell.

#### Bacterial adhesion and colonization to abiotic surface

For determination of initial bacterial adhesion and bacterial colonization of abiotic surface, round glass coverslips were inoculated in wells of a 24-well plate with 10<sup>7</sup> CFU of *Kp-Sp*<sup>R</sup>. Initial bacterial adhesion was determined after 3 h of incubation at 37 °C in the presence of chloramphenicol (35  $\mu g$ /mL), which inhibits de novo protein synthesis. Bacterial colonization was

determined in the same manner but in the absence of chloramphenicol. The coverslips were removed, rinsed with PBS, transferred into tubes containing 2 mL of PBS and sonicated for 3  $\times$  5 min. The resulting suspensions were then serially diluted and plated onto LB agar to determine the CFU number. The same procedure was used to evaluate bacterial colonization abilities in a competitive environment, but the inoculum was composed of equal proportions (10<sup>7</sup> CFU) of biofilm-dispersed *Kp-Ap*<sup>R</sup> and planktonic *Kp-Sp*<sup>R</sup> bacteria, resistant to ampicillin and spectinomycin, respectively. To determine the numbers of bacteria released in the supernatant during surface colonization, wells of a 24-well plate containing glass coverslips were inoculated with equal proportions (10<sup>7</sup> CFU) of biofilm-dispersed *Kp-Ap*<sup>R</sup> and planktonic *Kp-Sp*<sup>R</sup> bacteria. After 1 h of incubation at 37 °C, the glass coverslips were rinsed with PBS and placed in new plates containing 1 mL of fresh M63B1 medium and incubated at 37 °C for 2 further hours. The proportion of each bacterium inside the biofilm biomass and in the supernatant was determined by plating onto LB agar containing either ampicillin or spectinomycin.

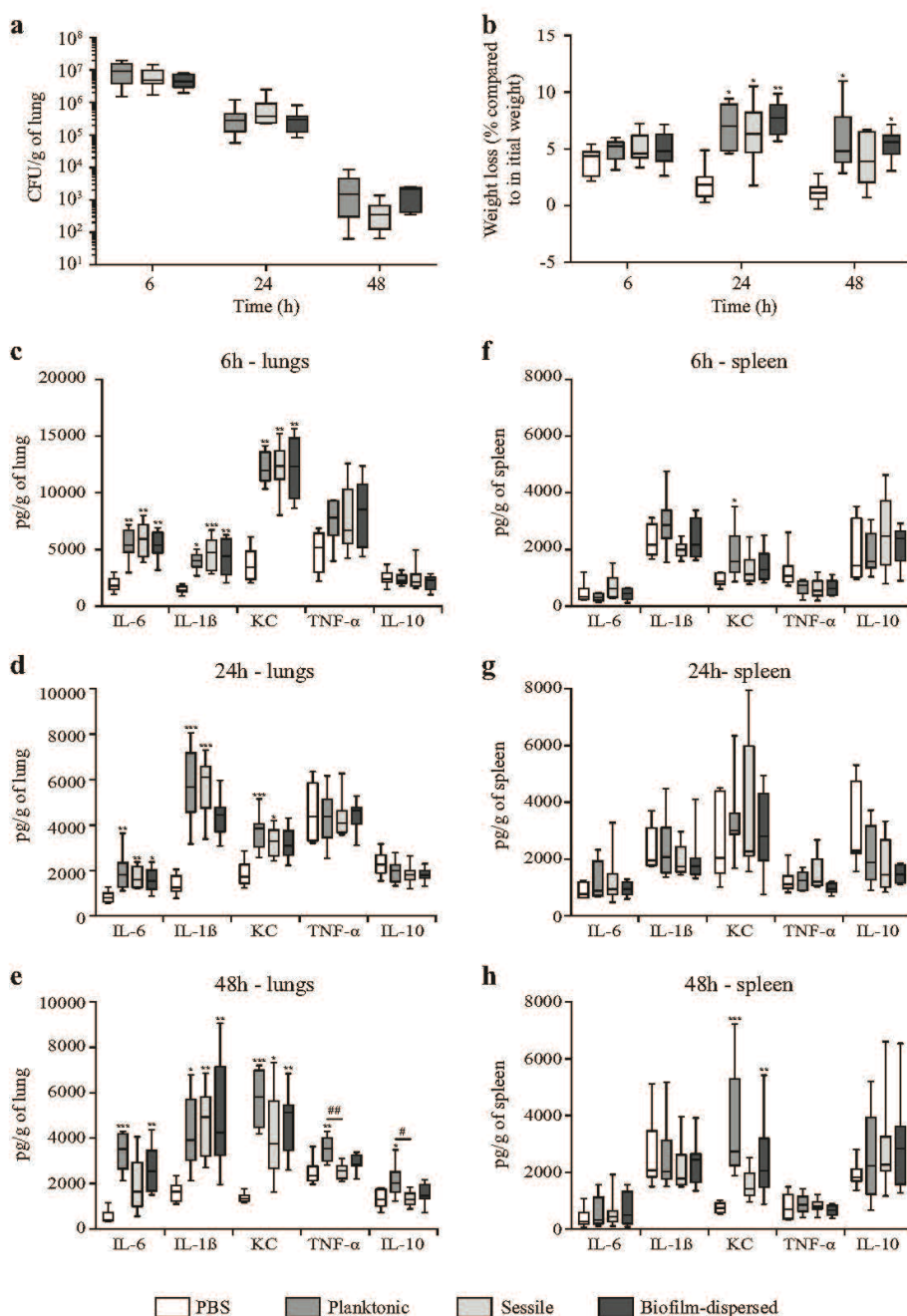
Bacterial colonization of glass substrates was also investigated by confocal microscopy. A total of 10<sup>7</sup> CFU were inoculated per chamber on a Lab-Tek® 8 chamber glass slide (Nunc - Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). In the context of competition, the inoculum was composed of 10<sup>7</sup> CFU of *Kp-GFP* and *Kp-mCherry* in equal proportions. Biofilm development was monitored at 37 °C for 3 h in real time (one acquisition every 20 min) with a SP5 confocal laser microscope (Leica, Wetzlar, Germany) using  $\times 40$  oil objective. GFP was excited by an argon laser (488 nm) and mCherry with the DPSS 561 laser (561 nm). Images represent the first optical section of the z-stack from the surface. Biofilm volumes were calculated with IMARIS software (Bitplane, Belfast, United Kingdom). Each confocal microscopy image is representative of three independent experiments.

#### Adhesion to and colonization of epithelial cells

A549 and FaDu epithelial cell monolayers were seeded in 24-well tissue culture plates (Falcon – Corning, New York, USA) at a density of 5  $\times$  10<sup>5</sup> cells per well on the day before the experiments. Cells were infected with biofilm-dispersed and planktonically growing *Kp-Sp*<sup>R</sup> such that the multiplicity of infection was 1 bacterium per cell (MOI<sub>1</sub>). To determine bacterial adhesion, chloramphenicol at 35  $\mu g$ /mL was added to the culture medium to inhibit bacterial growth. After 3 h of incubation, cells were washed two times with PBS, and lysed with 1% Triton X-100 in PBS. Samples were serially diluted, plated onto LB agar plates, and CFUs were determined.

#### Analysis of engulfment and degradation by macrophages

For bacterial engulfment and survival/multiplication within macrophages, J774A.1 monolayers were seeded in 24-well tissue culture plates (Falcon – Corning) at a density of 5.10<sup>5</sup> cells per well on the day before the experiments. Cells were then infected with *Kp-Sp*<sup>R</sup> resuspended in cell culture medium without antibiotics at a MOI<sub>100</sub>. Infected monolayers were



**Fig. 6** *K. pneumoniae* sessile and biofilm-dispersed bacteria induce an attenuated inflammatory response in a murine model after intra-nasal instillation. **a** Boxplots reflect numbers of *K. pneumoniae* cells recovered in the lungs of animals ( $n = 8$ ) at time points of 6, 24 and 48 h after inoculation of either planktonic, sessile or biofilm-dispersed bacteria. **b** Boxplots reflect weight loss ( $n = 8$ ) 6, 24 and 48 h after intra-nasal instillation of PBS or bacteria. **c–e** Lung and **f–h** spleen cytokine levels (IL-6, IL-1 $\beta$ , KC, TNF- $\alpha$ , and IL-10) from PBS-treated (white bars), planktonic (medium gray bars), sessile (light gray bars) and biofilm-dispersed (dark gray bars) bacteria infected mice at time points of 6 h (**c** and **f**), 24 h (**d** and **g**) and 48 h (**e** and **h**) after inoculation. Boxplots reflect cytokine levels ( $n = 8$ ). The values are displayed as box-and-whiskers plots with interquartile range, with the top portion of the box representing the 75th percentile, and the bottom portion representing the 25th percentile. The horizontal bar within the box represents the median. Statistics: non-parametric Kruskal–Wallis with Dunn’s multiple comparison test or Tukey’s multiple comparison test for ELISA experiments: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  in comparisons performed to the non-infected control; # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$

**Table 1.** Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description	Antibiotic resistances	Collection number	Source and/or reference
<b>Strains</b>				
<i>K. pneumoniae</i>				
LM21-GFP-Sp <sup>R</sup>	<i>K. pneumoniae</i> LM21 strain harboring the <i>gfpmut3</i> and <i>aadA7</i> genes	Sp	CH404	46
<i>Kp</i> -Ap <sup>R</sup>	<i>K. pneumoniae</i> clinicate isolate	Ap	CH1157	This study
<i>Kp</i> -Sp <sup>R</sup>	<i>Kp</i> -Ap <sup>R</sup> $\Delta$ <i>shv::aadA7</i>	Sp	CH1476	This study
<i>Kp</i> -GFP	mini-Tn7T-Km-GFP <i>mut3</i> inserted into <i>attTn7</i> sites of <i>Kp</i> -Sp <sup>R</sup>	Sp, Km	CH1477	This study
<i>Kp</i> -mCherry	mini-Tn7T-Km- <i>cCherry</i> inserted into <i>attTn7</i> sites of <i>Kp</i> -Sp <sup>R</sup>	Sp, Km	CH1478	This study
<i>E. coli</i> K-12				
MFD $\lambda$ pir	MG1655 RP4-2-Tc::[ $\Delta$ Mu1::aac(3)IV- $\Delta$ aphA-nic35-Mu2::zeo] $\Delta$ dapA::( <i>erm-pir</i> ) $\Delta$ recA	Ap, Zeo, Erm		47
<b>Plasmids</b>				
pTNS3	Helper plasmid, providing the Tn7 transposition function. R6K <i>ori</i> , <i>oriT</i>	Ap		48
pUC18R6KT-mini-Tn7T-Km	pUC18-based delivery plasmid for mini-Tn7-Km. R6K <i>ori</i> , <i>oriT</i>	Ap, Km		48
pUC18R6KT-mini-Tn7T-Km- <i>gfp</i>	pUC18-based delivery plasmid for mini-Tn7-Km- <i>gfp</i> harboring GFP encoding gene. R6K <i>ori</i> , <i>oriT</i>	Ap, Km		This study
pUC18R6KT-mini-Tn7T-Km- <i>mcherry</i>	pUC18-based delivery plasmid for mini-Tn7-Km- <i>mcherry</i> harboring mCherry encoding gene. R6K <i>ori</i> , <i>oriT</i>	Ap, Km		This study

Ap ampicillin, Sp spectinomycin, Km kanamycin, Zeo Zeocine, Erm erythromycin

centrifuged at  $1000 \times g$  for 10 min at 25 °C and then incubated for 20 min at 37 °C. Cells were washed twice with PBS, and fresh cell culture medium containing gentamicin at 50  $\mu$ g/mL was added for a 30 min (initial engulfment) or 24 h period (survival/multiplication). The numbers of intracellular bacteria were determined by CFU counting after washing cell monolayers twice with PBS and lysing them with 1% Triton X-100 in PBS. Bacterial engulfment was expressed as the mean percentage of bacteria recovered relative to the number of bacteria in the inoculum, defined as 100%. Bacterial survival/multiplication was expressed as the mean percentage of bacteria recovered at 24 h post infection relative to the number of engulfed bacteria, defined as 100%.

#### Analysis of the morphology of biofilm-dispersed bacteria

For SEP observations, *Kp*-Sp<sup>R</sup> bacteria were washed in PHEM rinsing buffer (PIPES: 60 mM; HEPES: 25 mM; EGTA: 10 mM; MgCl<sub>2</sub>: 2 mM) and fixed for 12 h at 4 °C in PHEM buffer, pH 8, which contained 0.05% red ruthenium and 1.6% glutaraldehyde. Samples were then washed 3  $\times$  10 min in PHEM buffer 1X, pH 8. They were post-fixed 1 h with 1% osmium tetroxide in PHEM buffer 1X, pH 8 and washed for 20 min in distilled water. Dehydration with graded ethanol was performed from 25 to 100% (10 min each) and finished in hexamethyldisilazane for 10 min. Bacteria were deposited on Thermanox slides<sup>®</sup> and dried under a fume hood overnight. The samples were then mounted on stubs with adhesive carbon tabs and sputter-coated with gold-palladium (JFC-1300, JEOL, Japan). Morphology analysis was carried out with a JSM-6060LV (JEOL) scanning electron microscope at 5 kV in high-vacuum mode.

The absence of bacterial aggregates in biofilm-dispersed population was determined by flow cytometry (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Briefly, *Kp*-Sp<sup>R</sup> biofilm-dispersed bacteria were centrifuged at  $6000 \times g$  at 4 °C for 5 min and the pellet was washed once and resuspended in PBS to a final concentration of  $10^6$  CFU/mL. Bacteria were labeled with DAPI (0.5  $\mu$ g/mL), and 50,000 DAPI-positive events were analyzed through the cytometer. Cell size and granularity were assessed by FCS and SSC measurements, respectively.

#### Mouse infections and cytokine analysis

Male C57BL/6J wild-type mice aged around 8 weeks were obtained from Charles River Laboratory (SAINT GERMAIN NUELLES, France). Mice strains were bred in a biosafety level 2 animal facility and raised and housed under standard conditions with air filtration. For infection experiments, the mice were housed in cages ventilated under negative pressure with high-efficiency

particulate filtered air. Animal protocols were carried out in strict accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the University Clermont Auvergne (France) and were approved by the Committee for Research and Ethical Issues of the Department of Auvergne (C2EA-02) following international directive 86/609/CEE (n°CE16-09), and the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFIS#6177-2016072110437265). Mice were anesthetized by a mixture of ketamine and xylazine (1 and 0.2 mg per mouse, respectively) and infected with  $1.10^6$  CFU/mouse by intranasal (IN) inoculation. Experiments were done with at least seven animals for each group. Body weight was monitored before IN inoculation and before sacrifice at time points of 6, 24 or 48 h after IN. Mice were sacrificed by cervical dislocation after 6, 24 or 48 h of IN inoculation, and the organs (lungs and spleen) were collected, weighed, and homogenized in sterile PBS. Bacterial load in the organs was determined by plating dilutions of the suspensions on LB agar for CFU quantification. Results are expressed as CFU/g of tissue. For cytokine quantification, tissues homogenates were centrifuged at  $13,500 \times g$  for 10 min, and levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , KC, TNF- $\alpha$ , and IL-10 were assessed in the supernatant with the DuoSet Kit for mice (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. Results are expressed as pg/g of tissue.

#### Statistical analysis

Mann-Whitney and one-way ANOVA (Kruskal-Wallis with Dunn's Multiple Comparison Test or Tukey's Multiple Comparison Test) tests were performed with Graph Pad Prism 6 software. A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant. \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001.

#### Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

#### DATA AVAILABILITY

All data generated or analyzed during this study are available upon request to the corresponding authors

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Caroline Vachias, Pierre Pouchin and Jean-Louis Couderc (CLIC - Université Clermont Auvergne) for their technical help in confocal imaging acquisition and data

analyses. We are grateful to Christelle Blavignac, Claire Szczepaniak and Lorraine Gameiro (CICS – Université Clermont Auvergne) for their technical help in flow cytometry and electronic microscopy experiments. We thank Herbert P Schweizer for providing the plasmid pUC18R6KT-mini-Tn7-Km. Cyril Guillen was supported by a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This work was supported by a 'Contrat Quinquennal Recherche, UMR CNRS 6023' and 'Nouveau Chercheur 2012, Région Auvergne'.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.G., S.M., C.F. and D.B. conceived and designed the experiments. C.G., S.M., N.C., G.C., L.J. and D.B. conducted experiments. C.G., S.M., C.F. and D.B. analyzed the data and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### ADDITIONAL INFORMATION

**Supplementary information** accompanies the paper on the *npj Biofilms and Microbiomes* website (<https://doi.org/10.1038/s41522-019-0098-1>).

**Competing interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### REFERENCES

1. Brisse, S., Grimont, F. & Grimont, P. In: *The Prokaryotes* (eds Dworkin, M. et al.) (Springer, New York, NY, 2006).
2. Chaves, J. et al. SHV-1  $\beta$ -lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2856–2861 (2001).
3. Nordmann, P., Cuzon, G. & Naas, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis.* **9**, 228–236 (2009).
4. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States (2013).
5. Wyres, K. L. & Holt, K. E. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **45**, 131–139 (2018).
6. Murphy, C. N. & Clegg, S. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiol.* **7**, 991–1002 (2012).
7. Chung, P. Y. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**, fnw219 (2016).
8. Adair, C. G. et al. Implications of endotracheal tube biofilm for ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med.* **25**, 1072–1076 (1999).
9. Nair, G. B. & Niederman, M. S. Ventilator-associated pneumonia: present understanding and ongoing debates. *Intensive Care Med.* **41**, 34–48 (2015).
10. Jones, R. N. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **51**, S81–S87 (2010).
11. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 711–745 (1995).
12. Karatan, E. & Watnick, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 310–347 (2009).
13. McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D. & Kjelleberg, S. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat. Rev. Micro.* **10**, 39–50 (2012).
14. Petrova, O. E. & Sauer, K. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Curr. Opin. Microbiol.* **30**, 67–78 (2016).
15. Guillen, C., Forestier, C. & Balestrino, D. Biofilm dispersal: multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties. *Mol. Microbiol.* **105**, 188–210 (2017).
16. Wang, R. et al. *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 238–248 (2011).
17. Fleming, D. & Rumbaugh, K. The consequences of biofilm dispersal on the host. *Sci. Rep.* **8**, 10738 (2018).
18. Pettigrew, M. M. et al. Dynamic changes in the *Streptococcus pneumoniae* transcriptome during transition from biofilm formation to invasive disease upon *Influenza A* virus infection. *Infect. Immun.* **82**, 4607–4619 (2014).
19. Chua, S. L. et al. Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. *Nat. Commun.* **5**, 4462 (2014).
20. Guillen, C. et al. Transcriptional profiling of *Klebsiella pneumoniae* defines signatures for planktonic, sessile and biofilm-dispersed cells. *BMC Genomics* **17**, 237 (2016).
21. Marks, L. R., Davidson, B. A., Knight, P. R. & Hakansson, A. P. Interkingdom signaling induces *Streptococcus pneumoniae* biofilm dispersion and transition from asymptomatic colonization to disease. *MBio* **4**, e00438–13 (2013).
22. Hay, A. J. & Zhu, J. Host intestinal signal-promoted biofilm dispersal induces vibrio cholerae colonization. *Infect. Immun.* **83**, 317–323 (2015).
23. MacKenzie, K. D. et al. Bistable Expression of CsgD in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Connects Virulence to Persistence. *Infect. Immun.* **83**, 2312–2326 (2015).
24. Barraud, N., Moscoso, J. A., Ghigo, J.-M. & Filloux, A. Methods for studying biofilm dispersal in *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Mol. Biol.* **1149**, 643–651 (2014).
25. Chua, S. L. et al. In vitro and in vivo generation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-dispersed cells via c-di-GMP manipulation. *Nat. Protoc.* **10**, 1165–1180 (2015).
26. Reddinger, R. M., Luke-Marshall, N. R., Hakansson, A. P. & Campagnari, A. A. Host physiologic changes induced by *Influenza A* virus lead to *Staphylococcus aureus* biofilm dispersion and transition from asymptomatic colonization to invasive disease. *mBio* **7**, e01235–16 (2016).
27. Nguyen, T.-K., Duong, H. T. T., Selvanayagam, R., Boyer, C. & Barraud, N. Iron oxide nanoparticle-mediated hyperthermia stimulates dispersal in bacterial biofilms and enhances antibiotic efficacy. *Sci. Rep.* **5**, 18385 (2015).
28. Berlanga, M., Gomez-Perez, L. & Guerrero, R. Biofilm formation and antibiotic susceptibility in dispersed cells versus planktonic cells from clinical, industry and environmental origins. *Antonie Van. Leeuwenhoek* **110**, 1691–1704 (2017).
29. Kragh, K. N. et al. Role of multicellular aggregates in biofilm formation. *mBio* **7**, e00237–16 (2016).
30. Cogan, N. G., Harro, J. M., Stoodley, P. & Shirtliff, M. E. Predictive computer models for biofilm detachment properties in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* **7**, e00815–16 (2016).
31. Khater, F. et al. In silico analysis of usher encoding genes in *Klebsiella pneumoniae* and characterization of their role in adhesion and colonization. *PLoS ONE* **10**, e0116215 (2015).
32. March, C. et al. Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. *PLoS ONE* **8**, e56847 (2013).
33. Schommer, N. N. et al. *Staphylococcus epidermidis* uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1. *Infect. Immun.* **79**, 2267–2276 (2011).
34. Cano, V. et al. *Klebsiella pneumoniae* survives within macrophages by avoiding delivery to lysosomes. *Cell. Microbiol.* **17**, 1537–1560 (2015).
35. Pauwels, A.-M., Trost, M., Beyaert, R. & Hoffmann, E. Patterns, receptors, and signals: regulation of phagosome maturation. *Trends Immunol.* **38**, 407–422 (2017).
36. Besold, A. N., Culbertson, E. M. & Culotta, V. C. The Yin and Yang of copper during infection. *J. Biol. Inorg. Chem.* **21**, 137–144 (2016).
37. Holden, V. I., Breen, P., Houle, S., Dozois, C. M. & Bachman, M. A. *Klebsiella pneumoniae* Siderophores Induce Inflammation, Bacterial Dissemination, and HIF-1 $\alpha$  Stabilization during Pneumonia. *MBio* **7**, e01397–16 (2016).
38. Ivin, M. et al. Natural killer cell-intrinsic type I IFN signaling controls *Klebsiella pneumoniae* growth during lung infection. *PLoS Pathog.* **13**, e1006696 (2017).
39. Rieu, A. et al. The biofilm mode of life boosts the anti-inflammatory properties of *L. actobacillus*: Immunomodulation by *Lactobacillus* biofilms. *Cell. Microbiol.* **16**, 1836–1853 (2014).
40. Watters, C., Fleming, D., Bishop, D. & Rumbaugh, K. P. Host Responses to Biofilm. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **142**, 193–239 (2016).
41. Regueiro, V. et al. *Klebsiella pneumoniae* subverts the activation of inflammatory responses in a NOD1-dependent manner. *Cell. Microbiol.* **13**, 135–153 (2011).
42. Bengoechea, J. A. & Sa Pessoa, J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiol. Rev.* **43**, 123–144 (2018).
43. Chaverche, M. K., Ghigo, J. M. & d'Enfert, C. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* **28**, E97 (2000).
44. Balestrino, D., Haagensen, J. A., Rich, C. & Forestier, C. Characterization of type 2 quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation. *J. Bacteriol.* **187**, 2870–2880 (2005).
45. Choi, K.-H. & Schweizer, H. P. mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Protoc.* **1**, 153–161 (2006).
46. Balestrino, D., Ghigo, J. M., Charbonnel, N., Haagensen, J. A. & Forestier, C. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. *Environ. Microbiol.* **10**, 685–701 (2008).
47. Ferrieres, L. et al. Silent Mischief: bacteriophage Mu insertions contaminate products of *Escherichia coli* random mutagenesis performed using suicidal transposon delivery plasmids mobilized by broad-host-range RP4 conjugative machinery. *J. Bacteriol.* **192**, 6418–6427 (2010).



48. Choi, K.-H. et al. Genetic tools for select-agent-compliant manipulation of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 1064–1075 (2008).



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party

C. Guillen et al.

npj

11

material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

## Supplementary information

### Colonization and immune modulation properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilm-dispersed cells

**Authors:** Cyril Guilhen,<sup>a\*</sup> Sylvie Miquel,<sup>a</sup> Nicolas Charbonnel,<sup>a</sup> Laura Joseph,<sup>a</sup> Guillaume Carrier,<sup>b\*</sup> Christiane Forestier,<sup>a</sup> Damien Balestrino<sup>a#</sup>

**Affiliations:**

<sup>a</sup>Université Clermont Auvergne , CNRS 6023, LMGE, Clermont-Ferrand , France

<sup>b</sup>Université Clermont Auvergne , Inserm U1071, USC-INRA 2018, M2iSH, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand , France

<sup>#</sup>Correspondence to: Damien Balestrino, [damien.balestrino@uca.fr](mailto:damien.balestrino@uca.fr)

**\*Present address:**

Cyril Guilhen, Université de Genève, Centre Médical Universitaire, Département de Physiologie Cellulaire et Métabolisme, Genève, Suisse

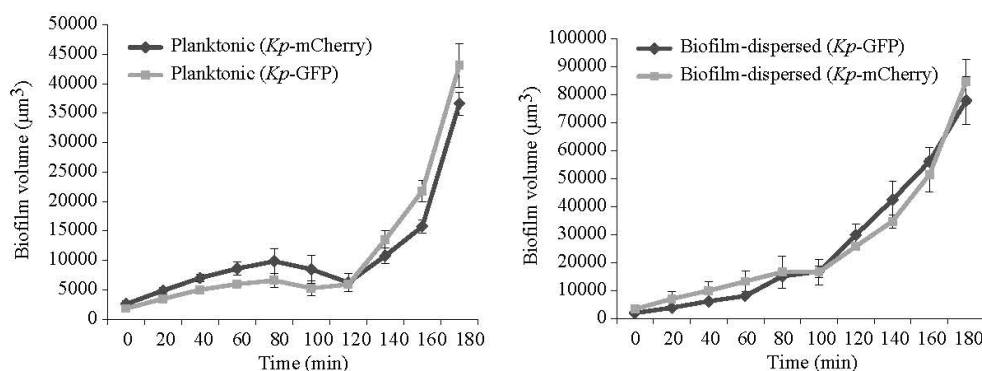
Guillaume Carrier, Institut du Cancer de Montpellier, Montpellier, France

## Supplementary Methods

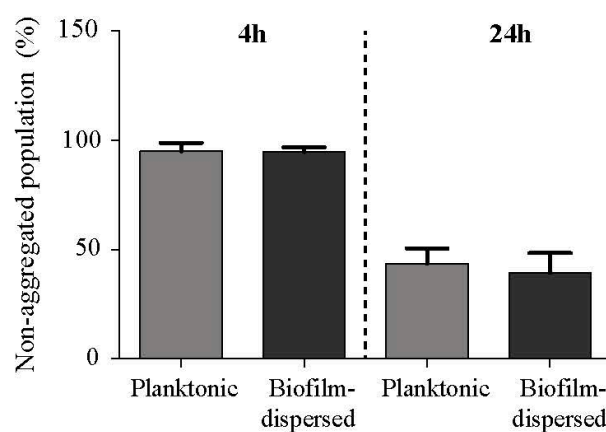
**Autoaggregation test.** Exponential planktonic and biofilm-dispersed bacteria suspensions were adjusted to  $OD_{620} = 0.5$ , and 3-ml portions of each culture were transferred to 5-ml tubes. The tubes were incubated without agitation at room temperature. The  $OD_{620}$  of the upper part of the suspension in each standing tube was determined after 4h and 24h of incubation.

**MATS assay.** The Microbial Adhesion To Solvents (MATS) test was performed to evaluate the Lewis acid-base properties and the hydrophilic/hydrophobic nature of bacterial surfaces. Biofilm-dispersed and exponential planktonic bacteria were washed twice with PBS at pH 7.0, and resuspended in the same solution at a final  $OD_{620}$  of 0.5. Each bacterial suspension (1mL) was mixed for 1min at maximum intensity on a vortex-type agitator with 0.2 ml of chloroform, hexadecane, diethyl ether, hexane, ethyl acetate or decane. The mixtures were allowed to stand for 1h to ensure complete separation of the two phases. A 0.8mL sample was then carefully removed from the aqueous phase and its  $OD_{600}$  was measured. The microbial affinity for each solvent was calculated using the formula: % affinity for the solvent =  $(OD_{(T0)} - OD_{(T1h)}) / OD_{(T0)} \times 100$  where  $OD_{(T0)}$  is the optical density of the bacterial suspension before its mixture with the solvent and  $OD_{(T1h)}$  the absorbance after mixing and phase separation. Each experiment was performed in triplicate. Three solvent pairs were assayed: (i) chloroform and hexadecane, (ii) diethyl ether and hexane, and (iii) ethyl acetate and decane.

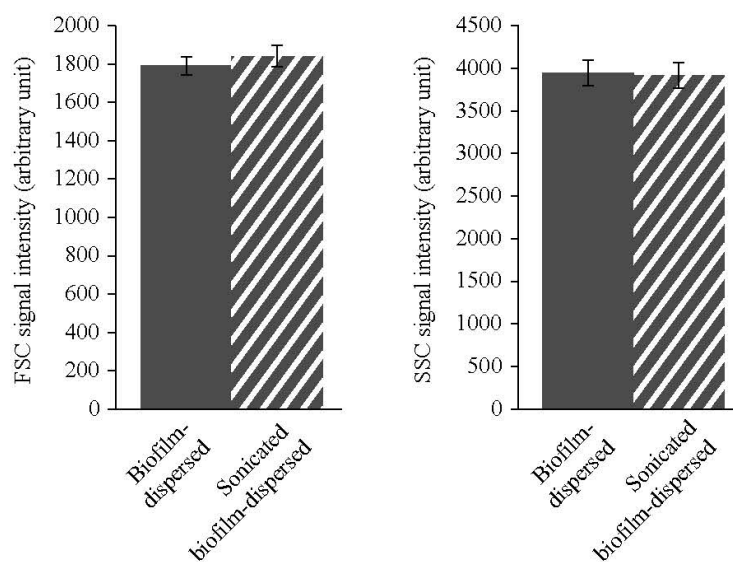
## Supplementary Figures



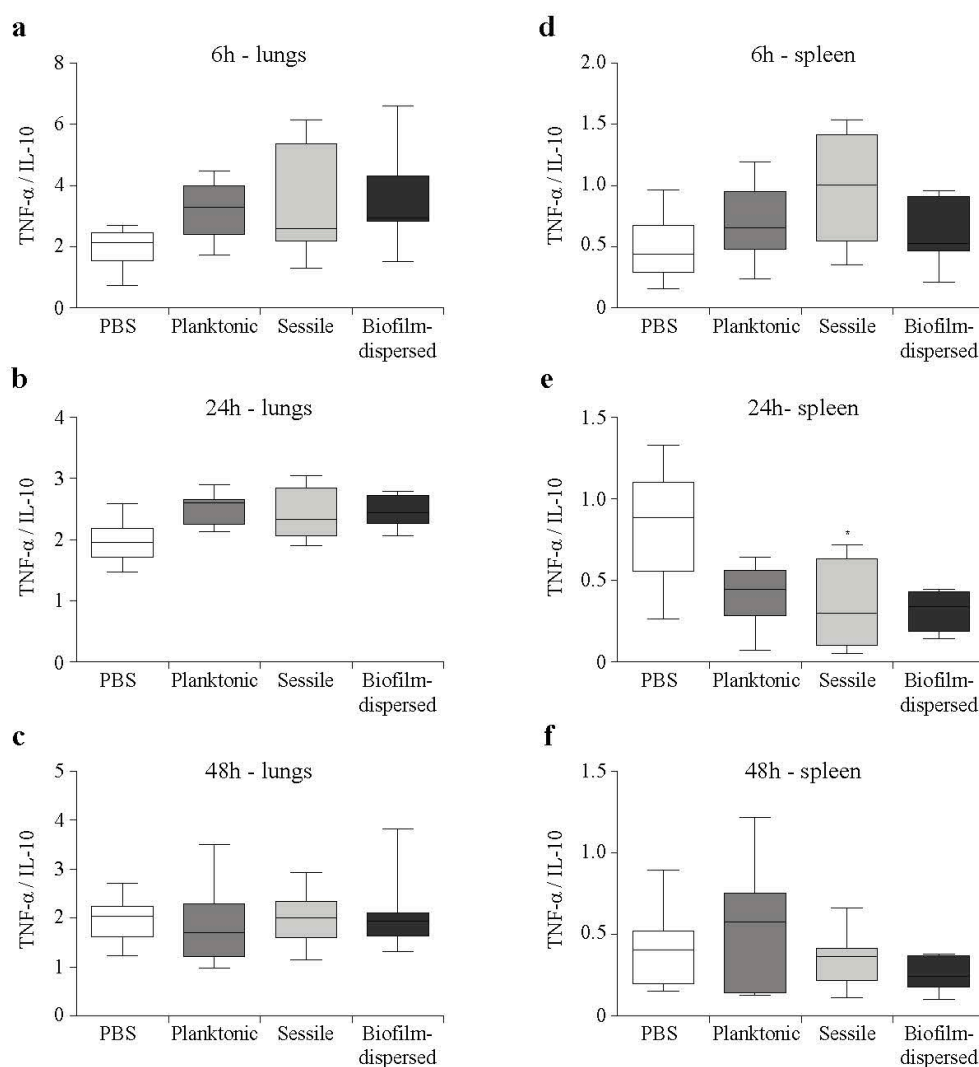
**Supplementary Figure 1:** The nature of the fluorescent protein had no impact on the bacterial kinetics of colonization. Lab-Tek® glass surface was seeded at T0 with equal numbers of two clones of a given lifestyle, either planktonic or biofilm-dispersed, tagged with different fluorochromes (GFP or mCherry). Their colonization abilities were assessed during 3h of incubation by confocal imaging. Biofilm volumes were calculated with IMARIS software and are represented in  $\mu\text{m}^3$ . The different bacterial populations were distinguished by their differential fluorochromes (GFP or mCherry). Values represent mean  $\pm$  s.e.m ( $n = 3$ ). Statistics: non-parametric Mann-Whitney test: \*,  $p < 0.05$ .



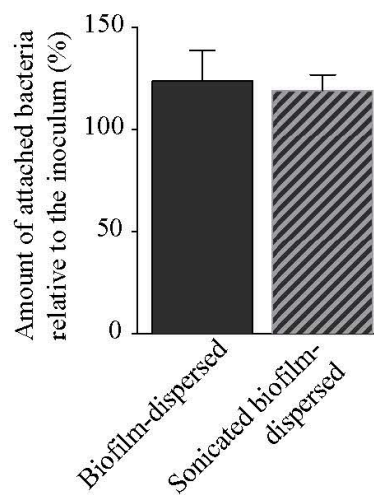
**Supplementary Figure 2:** Autoaggregation phenotype was similar in biofilm-dispersed and planktonic lifestyles. Autoaggregation assay was performed with exponential planktonic and biofilm-dispersed bacteria. Bacterial suspensions were adjusted to  $OD_{620} = 0.5$  in M63B1 in a 3 ml volume and autoaggregation of each suspension over 4h and 24h at room temperature was evaluated by measuring the  $OD_{620}$  of the upper part of the culture in each standing tube. Values represent the  $(OD_{620}$  at the indicated time point /  $OD_{620}$  at T0)  $\times 100$ . Results are expressed as mean  $\pm$  s.e.m ( $n = 4$ ). Statistics: non-parametric Mann-Whitney test.



**Supplementary Figure 3:** Biofilm-dispersed bacteria did not comprise aggregates. Flow-cytometry analysis of biofilm-dispersed *K. pneumoniae* bacteria, sonicated or not, based on size (Forward Scatter; FSC) and structure (Side Scatter; SSC). Results are presented as the means of signal intensity for each channel. Each value is the mean of three independent experiments. Values represent mean  $\pm$  s.e.m ( $n = 3$ ). Statistics: non-parametric Mann-Whitney test.



**Supplementary Figure 4:** TNF- $\alpha$ /IL-10 ratio calculated for each animal from cytokine levels detected in lungs (a-c) and spleen (d-f) at time points of 6h (a and d), 24h (b and e) and 48h (c and f) after inoculation. Boxplots reflect TNF- $\alpha$ /IL-10 ratio ( $n=8$ ). The values are displayed as box-and-whiskers plots with interquartile range, with the top portion of the box representing the 75<sup>th</sup> percentile, and the bottom portion representing the 25<sup>th</sup> percentile. The horizontal bar within the box represents the median. Statistics: non-parametric Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test or Tukey's multiple comparison test for ELISA experiments: \*,  $p < 0.05$  in comparisons performed to the non-infected control (PBS).



**Supplementary Figure 5:** Disruption of the potential aggregates by 3x5 min of sonication had no impact on the colonization capabilities of biofilm-dispersed bacteria. The glass surface colonization was assessed in the absence of chloramphenicol. Results are presented as the percentages of adherent bacteria after 3h of incubation compared to the CFU in the inoculum. Values represent mean  $\pm$  s.e.m ( $n = 3$ ). Statistics: non-parametric Mann-Whitney test



## Supplementary Movie

**Supplementary Movie 1:** The kinetics of colonization of a glass surface in a context of competition (biofilm-dispersed bacteria versus planktonic bacteria) was monitored by confocal microscopy for 3h (one acquisition every 20 min). Cells derived from biofilm-dispersed and planktonic bacteria were distinguished by their specific fluorescent color: bacteria from planktonic cultures were tagged in green (GFP), and bacteria from biofilm-dispersed populations were tagged in red (mCherry). Images represent the first optical section of the z-stack from the surface.

## Supplementary Table

**Supplementary Table 1.** Lewis acid–base and hydrophobicity surface characteristics

Growth conditions	% Affinity to solvent (MATS)					
	Chloroform	Hexadecane	Diethyl ether	Hexane	Ethyl acetate	Decane
Exponential planktonic	21.21±0.43	8.43±0.56	12.06±0.50	7.36±0.47	0.59±0.55	8.65±0.40
Biofilm-dispersed	21.43±0.36	4.99±0.46	12.58±0.23	6.83±0.31	1.84±0.55	6.59±0.70

Whatever the solvent, the affinity to solvent was not significantly different ( $p < 0.05$ ) between the samples “exponential planktonic” and “biofilm-dispersed”. Statistics: non-parametric Mann-Whitney test.