



Système de sécrétion de type VI chez *Klebsiella pneumoniae* : dialogue moléculaire et / ou arme antibactérienne ?

Thomas Merciecca

► To cite this version:

Thomas Merciecca. Système de sécrétion de type VI chez *Klebsiella pneumoniae* : dialogue moléculaire et / ou arme antibactérienne ?. Microbiologie et Parasitologie. Université Clermont Auvergne, 2022. Français. NNT : 2022UCFAC080 . tel-04099099

HAL Id: tel-04099099

<https://theses.hal.science/tel-04099099>

Submitted on 16 May 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 D'UNIVERSITE

Spécialité Microbiologie

Soutenue le 19/12/2022

Par

Thomas MERCIECCA

SYSTÈME DE SÉCRÉTION DE TYPE VI CHEZ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* :

DIALOGUE MOLÉCULAIRE ET / OU ARME ANTIBACTÉRIENNE ?

Président de jury : Pr BARNICH Nicolas, Professeur, UCA, M2iSH, Clermont-Ferrand, France

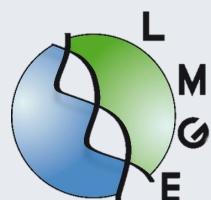
Examinateur : Dr CHAIN Florian, Ingénieur de recherche, INRAE, Institut Micalis, Jouy-en-Josas, France

Rapporteurs : Dr BRISSE Sylvain, Directeur de recherche, Institut Pasteur, BEBP, Paris, France

Dr MERIEAU Annabelle, Maître de conférences, Université de Rouen, CBSA, Rouen, France

Directeurs de thèse : Pr FORESTIER Christiane, Professeur, UCA, LMGE, Clermont-Ferrand, France

Dr MIQUEL Sylvie, Maître de conférences, UCA, LMGE, Clermont-Ferrand, France



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le **Dr Sylvain BRISSE** et le **Dr Annabelle MERIEAU** pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse, et d'être les rapporteurs de ce manuscrit qui, je l'espère, saura retranscrire au plus juste les travaux réalisés pendant ces 3 années de doctorat. Merci également aux examinateurs, le **Pr Nicolas BARNICH** et le **Dr Florian CHAIN** pour leur participation à la soutenance de cette thèse et pour leur contribution à l'évaluation de ce travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements au **Pr Christiane FORESTIER**, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour la confiance accordée pendant toute cette période passée à ses côtés. Je ne saurais vous dire à quel point je vous suis reconnaissant d'avoir su toujours prendre du temps pour moi, bien que si précieux pour vous, j'en suis conscient. Vous représentez beaucoup pour moi et avez su me donner goût à ce monde de la recherche, mille fois merci Christiane. En vous souhaitant beaucoup de choses pour votre nouvelle vie et en espérant vous avoir laissé un bon souvenir de mon bref passage au laboratoire.

C'est avec une certaine émotion que je remercie tout particulièrement le **Dr Sylvie MIQUEL**, pour m'avoir épaulé tout au long de ce travail, au quotidien, dans les bons comme dans les mauvais moments. Sylvie... Qu'elle fût longue cette route... ! Mais quel bonheur est-ce d'y être arrivé. Je ne saurais te remercier assez. C'est à tes côtés que j'ai appris à découvrir ce qu'est le métier de chercheur, je t'en suis très reconnaissant. Une relation de presque 4 ans et demi, pas tout le temps des plus évidentes, mais je te promets de garder un très bon souvenir de tout le travail effectué avec toi, et espère qu'il en sera de même de ton côté. Grâce à toi j'ai pu explorer un sujet passionnant qui est loin d'être tout le temps évident, mais tellement stimulant ! Je te remercie infiniment pour tout ce que tu m'as enseigné, et te souhaite le meilleur, pour toi, ainsi que pour toute ta petite famille.

Marjolaine, Damien B., merci à vous deux d'avoir été de très bon conseil de nombreuses fois, et pour votre soutien et votre contribution au rendu de ce travail de thèse. Je vous souhaite également le meilleur pour la suite, professionnellement comme personnellement.

Laurence, ma « Lolotte » que je suis content de t'avoir rencontrée. J'ai pris énormément de plaisir à travailler avec toi, et ai appris énormément de choses grâce à toi. Au-delà de ça, je garderai d'impérissables souvenirs des pauses cigarettes passées avec toi, et de ton rôle de « maman » du labo, qui m'a aidé tant de fois... Pour tout ça, je t'envoie mes plus chaleureux remerciements.

Nicolas, le « chef », tu resteras mon maître Jedi de la bio mol'. Merci pour ton aide si précieuse pour les manips, ta bonne humeur et nos discussions passionnantes autour de nos différences d'âge... d'expérience ! Prends soin de toi et de tes proches.

Valérie, merci pour tous les bons moments passés à tes côtés. Toujours présente pour m'aider et toujours pleine de bonne volonté, tu as toujours été bienveillante avec moi. Pour ton humour, ta patience, ta bonne humeur et tant de choses encore, je te souhaite le meilleur pour la suite.

Maëva S., ma petite Maëva, tu vas me manquer... Merci pour tout ce soutien sans faille et les bonnes ondes que tu as toujours su me transmettre. Tu as largement contribué au bon déroulé de ce travail, merci, merci, merci ! Je suis si content de t'avoir connue et nos discussions passion F1 / rugby vont vraiment me manquer également. Je suis si heureux pour toi que ta petite famille entre bientôt dans une nouvelle ère, embrasse **Damien** pour moi.

Merci à **Marie-Pierre** et **Patricia**, pour votre bonne humeur et votre soutien permanent, les autoclaves de dernière minute... Vous formez un duo hors normes, fraîchement séparé mais c'est pour mieux vous retrouver... Merci à vous deux.

Manjyot, I am so grateful and happy for you to now know that you'll be part of the lab for the next few years! I was so happy to work with you, and to talk with you when we could... I'll keep great memories from us! Thank you so much for your support and I wish you the best for your PhD!

Damien & Mélyssa, les 2 normands ! Quel beau couple vous faites. Je suis très content de vous avoir rencontrés tous les deux et vous souhaite vraiment le meilleur pour la suite, merci pour les soirées ensemble, et les moments de rires qui font tant de bien pendant cette période compliquée... Merci Damien pour m'avoir supporté durant l'ECCMID au Portugal ! Une chouette expérience que j'ai pris énormément de plaisir à partager avec toi et dont je garderai des souvenirs exceptionnels !

Ibrahima et Mélodie, merci pour les moments partagés, malgré le peu de temps passé ensemble, et je vous souhaite également le meilleur pour la suite en espérant que vous passerez autant de bons moments dans ce laboratoire que ceux que j'ai pu traverser.

Philippe B, Geneviève, Isabelle, Claire, Ousmane, Yoann, Florence, quel honneur d'avoir fait partie de votre équipe et d'avoir appris à vos côtés. Philippe, je compte sur toi pour tenir la barre sous ta nouvelle super casquette ! Toutes mes félicitations pour cela. Geneviève, je garderai un souvenir incroyable du Portugal ensemble également, et suis très content de t'avoir rencontrée. Tu es quelqu'un que j'apprécie beaucoup et que j'espère revoir après la fin de cette thèse. Isabelle, merci pour ta bonne humeur et les discussions partagées. En te souhaitant le meilleur également. Merci à Claire et Ousmane de m'avoir accueilli deux fois en HH, où ma passion pour la microbiologie s'est plus que confirmée.

Vincent et Roxane, gardez le cap mes petits, ne lâchez rien ! Content d'avoir pu vous connaître tous les deux, et j'espère pouvoir être là pour vos soutenances respectives ! Prenez soin de vous.

Eric C, quel honneur d'avoir pu travailler avec toi et je te suis très reconnaissant d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse, ta participation nous a été plus que bénéfique et je te remercie grandement pour ta bienveillance, ton aide technique et scientifique si précieuse.

Stéphanie et Olaya, merci pour toute l'aide précieuse que vous nous avez apportée pour toute la bio-informatique... Grâce à vous, j'ai appris énormément de choses dans ce domaine, ce qui n'était pas chose facile à la base !

Merci à l'intégralité de nos collaborateurs et (anciens) voisins du laboratoire M2iSH, **Nicolas, Delphine, Guillaume, Elisabeth, Jérémy, Mathilde, Michael, Adeline, Pedro, Alexandra, Caroline, Gwen, Devon, Laurent...** ainsi que **tous les doctorants du laboratoire**, pour votre aide technique précieuse et tous les dépannages express pour les manips... J'aurai une pensée particulière pour **Hélène**, ma « filleule » à qui je souhaite de venir compléter ces jolis résultats chez *E. coli*. J'ai beaucoup aimé nos discussions sur ce sujet passionnant qu'est le SST6 ! Enfin, **Mélissa**, on y est enfin arrivés, on peut être fier de nous ! Je suis très content pour toi, tu es très méritante. Merci pour ton soutien si précieux pour l'élaboration de ce travail et ton expertise des PDF !

Merci à tous les **doctorants du laboratoire LMGE**, passés, présents de m'avoir soutenu et aidé dans ma démarche d'apprentissage en tant que jeune chercheur, je vous dois beaucoup (et pour toutes nos soirées COVID également...). Merci beaucoup à **Aizat, Maxime D, Maxime F, Marina, Hélène G, Arthur, Thomas, Marine VB, Fanny** et tous les autres.

Merci à **Maëva M.**, ma marraine, pour m'avoir épaulé et pour ta bienveillance lors des comités de thèse. Plein de bonheur pour la suite, et de la réussite pour ta nouvelle vie niçoise !

J'ai également une petite pensée pour **Sabrina B**, à qui je souhaite une pleine réussite dans la suite de son projet de thèse, tu m'as beaucoup touché et tu as beaucoup de mérite. A très vite !

Une pensée à tous mes collègues doctorants que j'ai pu croiser pendant cette thèse de près ou de loin et avec qui ce fut toujours un plaisir d'échanger des mots ou des bières ! Merci à **Charlotte, Guerric, Louis D, Margaux, Nazarine, Sandie, James et Estelle, Audrey, Fanny, Damien D, Thomas S** et tous ceux que j'oublie !

Merci à tout le **LMGE**, ainsi que tous nos collaborateurs et structures ayant contribués de près ou de loin à l'élaboration de ce travail de thèse, sans qui rien n'aurait été possible et notamment la plateforme **SYSTEM**, la plateforme **CICS**, le laboratoire **MEDIS**, le laboratoire **NeuroDol**, l'**INRAE** d'Aurillac, le **LISM** à l'Université d'Aix Marseille et l'**institut Pasteur** de Paris.

Papa, mon premier fan... J'espère que tu seras fier de ton fils, qui s'est tant investi dans son travail depuis tout gosse pour faire la fierté de son père. Tout n'a pas toujours été tout rose, mais tu l'as apporté, ta pierre, ton rocher, à cet édifice. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, je ne pourrais jamais te remercier assez. Il me reste à te souhaiter une bonne et heureuse retraite, ainsi que de prendre soin de **Claire**, pour qui j'ai beaucoup d'affection et je vous souhaite plein de bonheur à tous les deux.

Maman, je n'aurai jamais assez de pages ni de mots dans mon vocabulaire pour te remercier de tout ce que tu as fait pour moi, de ce qui fait que je suis si fier d'être ton fils. Tu es mon exemple de force et de courage, et jamais personne ne saura prendre la place si précieuse que tu occupes dans ma vie. Pour toi et pour tout ce que je te dois, mille fois merci. Je t'aime. J'aime à croire que le reste de ta vie avec Bruno sera ton idylle. **Bruno**, merci pour tout ce que tu as fait pour moi, et pour tout ce que vous représentez toi et tes garçons **Jules** et **Louis** désormais en tant que famille.

Marine et **Robin R**, « Minou et Noumi » si vous saviez comme je vous suis reconnaissant l'un et l'autre d'avoir toujours été là pour moi. Je ne saurais vous dire à quel point votre soutien et votre présence quotidienne m'est chère. Ma sœur, je suis si fier de toi. Tu as un cœur « gros comme ça » et je sais que tu sauras mettre cette qualité en application dans ta nouvelle vie d'aide-soignante. Je t'embrasse et te souhaite plein de réussite. Robin, mon frère. J'aimerais te dire que je ne m'inquiète pas pour toi, sachant tout ce que l'on s'est déjà dit et l'estime que je te porte. Mais s'il te plaît, met un casque la prochaine fois quand même... Je suis fier de faire partie de la grande famille des motards et ne vous remercierai jamais assez de m'avoir mis le pied à l'étrier. V à vous deux.

Valentine, mon âme sœur, je suis si heureux de partager ta vie désormais. Si cette thèse ne m'a pas toujours réservé que des bonnes surprises, tu es sans aucun doute la meilleure de toutes. Tu mérites tellement de choses. Je ne saurais te dire à quel point je suis heureux à tes côtés, chaque jour. Tu as su redorer cette confiance en moi et tu sais toujours trouver les mots justes pour me redonner ce sourire que tu aimes tant. Et tant que tu seras près de moi, je te promets de le garder. Je te dois énormément pour ce travail de thèse et je t'en suis tellement reconnaissant. Je suis si fier de toi, tu es brillante, toi aussi... Fier de tout le travail que tu fournis au quotidien pour permettre à ce projet auquel tu tiens tant d'avancer, bien que ce serait cool d'arrêter de faire du mal à ces pauvres mice (L'EXCES)... Mais surtout, je suis fier de nous. De tout ce qui nous arrive, et de ce qui, je l'espère de tout cœur, nous arrivera encore. Avec beaucoup d'émotion, je te dis merci. Merci pour tellement de choses. Je t'aime.

Laura, si j'avais dû parler sur toi et moi après tout ce chemin parcouru. Je n'oublierai jamais ces moments passés avec toi dans le laboratoire, mais surtout en dehors. J'ai trouvé en toi ma meilleure amie avec qui rien n'est tabou, rien n'est impardonnable. Tu as été ma boussole pendant ces 3 années, et j'ai trouvé en toi un réconfort inimaginable. Je suis fier de toi Dr Joseph, et à la fois si triste de ne pas avoir pu être là pour ta soutenance, je te promets de me rattraper pour cela et espère que tu ne m'en veux pas. Merci d'être toi tout simplement. (« Et pose ce transistor... »)

Julien, je ne saurai jamais être aussi original que toi pour écrire des proses à l'effigie des gens, n'est-ce pas... ? Mon frérot. On dit toujours que les vrais amis se comptent sur les doigts d'une main. Si j'ai eu du mal à t'apprivoiser, je vais avoir encore plus de mal à te quitter aujourd'hui. C'est confiant et (tellement) fier de toi, que je te souhaite une pleine réussite pour ta thèse et pour ta vie future avec ma **Lulu**. Je vous aime profondément et espère vous voir ensemble encore très longtemps. Notre trio infernal avec Laura aura été aussi bref qu'intense, et vous allez vraiment me manquer. Ne m'oubliez pas.

Gaby, ma poule, je suis si fier d'être ton ami, et surtout d'être le parrain de cette belle petite poupée qui est arrivée récemment. On se le dit toujours, mais si on avait dû mettre un centime sur ce que l'on est devenu... Tu incarnes pour moi une force tranquille, par ton métier si respectable mais aussi dans ta nouvelle vie de papa gâteau. J'embrasse **Célia**, qui fait une maman radieuse et que j'aime profondément. Ne changez rien, et encore merci d'avoir fait de moi le parrain de votre petite fille. Je saurai honorer la confiance que vous m'accordez.

Robin B, mon Rob'. Je suis tellement content que tu sois arrivé à vivre de ta passion, et que tu aies eu le courage d'abandonner le lycée (au sens propre comme au sens figuré, cc la salle de physique-chimie) et le baby-foot pour maîtriser ton art. Cela va faire bien trop longtemps que tu me supportes, mais je suis heureux de partager tous ces moments importants de la vie avec toi, car des amitiés de longue date comme celles-ci, ne peuvent être rompues. Prends soin de toi et de toute ta famille.

Blandine, merci pour tous ces moments partagés avec toi, et je sais que tu vas trouver ta place dans cet univers particulier qu'est la thèse, ne lâche pas, tu vas y arriver, je n'en doute pas. Merci pour ton soutien sans faille, et j'espère que l'on continuera les apéros avec la bande jusqu'à plus soif ! Take care.

Nanou, ma tata, si heureux que l'on ait gardé cette complicité toi et moi après toutes ces années, de tout petit, jusqu'à maintenant... Merci pour tout ce que tu fais pour moi et d'être ce que tu es.

Marco, milles merci pour avoir été là toutes ces années et je suis conscient de tous les efforts que tu as fait pour donner toutes ces opportunités à ton neveu et qui ont contribués de près comme de loin à l'élaboration de ce doctorat aujourd'hui.

J'aurai une pensée toute particulière pour mes grands-parents **Charley et Marthe, André et Jeanine**. Je suis un petit fils heureux et qui réalise la chance de pouvoir s'adresser directement à vous quatre à travers ces lignes.

Philippe, Dominique, Roxane et Bastian, vous êtes ma deuxième famille et je ne saurais exprimer correctement tous ces liens qui nous lient depuis toujours. Vous représentez beaucoup pour moi, et je suis beaucoup trop heureux de faire partie de cette si jolie histoire franco-chilienne, ayant donné naissance à la plus chou des princesses. Ma **Bonnie**, bienvenue dans la famille MercieColl, et sache que tu fais la fierté de tes parents. A vous quatre, je vous envoie tous mes vœux de bonheur. Je vous aime.

Pascal et Steph', je vous adresse de sincères remerciements à tous les deux, pour tous les moments partagés ensemble et la complicité que nous avons réussi à créer au cours de ces années. Merci pour votre soutien sans faille, votre présence et tout ce que vous pouvez faire pour la famille au quotidien.

Aux copains **Gaetan et Nao, Maxime, Luc, Florian** je pense fort à vous les potes. Je suis sûr que vous saurez me pardonner d'avoir été un peu absent ces derniers temps, mais je vous assure, cela en valait la peine. Merci d'avoir toujours été là et surtout, ne changez rien. A très vite.

Enfin, j'adresse mes plus douces pensées à ma famille paternelle, **Charley père et fils, Laurie, Jeanne, Patrick et Isabelle**, ainsi qu'à ma famille maternelle **Brigitte et Serge, Florent et Julien, Christine et Thierry, Nicolas et Manon, Pierre et Marion** et leurs enfants.

A Léna, ma princesse, ne grandis pas trop vite...

LISTE DES ABREVIATIONS	1
INDEX DES ILLUSTRATIONS.....	4
RESUME.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	10
PARTIE 1 : <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	11
I. <i>Klebsiella pneumoniae</i> : de la pathogénicité à la virulence.....	11
1. Taxonomie	11
1.1. Classification du genre <i>Klebsiella</i>	11
1.2. Classification de l'espèce <i>K. pneumoniae</i>	12
2. Epidémiologie	12
2.1. Une bactérie adaptée à tous les environnements	12
2.2. Une bactérie commensale et/ou pathogène ?.....	13
3. Infections nosocomiales vs infections communautaires.....	13
3.1. Souches classiques et antibio-résistance	14
3.2. Souches hypervirulentes	15
4. Facteurs de pathogénicité de <i>Klebsiella</i>	17
5. Capacité à former du biofilm	17
II. Un modèle animal pour étudier la physiopathologie des infections à <i>K. pneumoniae</i>	21
1. Publication n°1	21
2. Le microbiote intestinal, un organe à part entière.....	51
2.1. Composition du microbiote intestinal.....	51
2.2. Rôles du microbiote intestinal.....	53
2.3. Facteurs influençant la composition du microbiote.....	56
3. <i>K. pneumoniae</i> : de la colonisation à l'infection.....	58
3.1. Facteurs de pathogénicité impliqués spécifiquement dans la colonisation	59
3.2. <i>K. pneumoniae</i> et microbiote intestinal : un point d'équilibre	60
PARTIE 2 : LE SYSTEME DE SECRETION DE TYPE VI.....	65
I. La sécrétion des protéines chez les bactéries	65
1. L'export des protéines vers le périplasme.....	65
1.1. Le système Sec.....	65
1.2. Le système Tat.....	67
2. Les systèmes de sécrétion	67
2.1. Le système de sécrétion de type II (SST2)	68
2.2. Le système de sécrétion de type IV (SST4).....	70
2.3. Le système de sécrétion de type VI (SST6)	72
II. Le système de sécrétion de type VI (SST6)	72
1. Organisation génomique	73
2. Organisation structurale et fonctionnelle	74
2.1. Le complexe membranaire.....	76
2.2. La plaque de base	77
2.3. La queue contractile	78
2.4. Rôle pivot des protéines TssA et TssA-like	79

2.5. Contraction et recyclage des sous unités : l'importance de ClpV	81
3. Rôles du SST6	82
3.1. Les effecteurs du SST6 : un véritable arsenal bactérien.....	82
3.2. Toxicité du SST6 vis-à-vis des cellules eucaryotes.....	86
3.3. Activité antibactérienne	89
3.4. Modulation des communautés polymicrobiennes.....	93
3.5. SST6 : un outil d'évolution et le fitness bactérien.....	97
4. Régulation du SST6	98
4.1. Mécanismes de la régulation du SST6.....	99
4.2. Stress environnementaux modulant l'expression du SST6	100
TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	103
Publication N°2.....	104
COMMENTAIRE D'ARTICLE	119
1. Caractérisation fonctionnelle du SST6-1 codant la toxine Tle1 chez <i>K. pneumoniae</i> CH1157.....	120
1.1. Caractérisation du système toxine/anti-toxine Tle1/Tli1.....	120
1.2. Test de l'activité antibactérienne de Tle1 par contact direct	122
1.3. Régulation de l'expression du SST6-1 chez <i>K. pneumoniae</i> CH1157.....	123
2. Caractérisation du rôle du SST6-2 codant la toxine Tke.....	125
2.1. Caractérisation de Tke : structure et fonction	126
2.2. Régulation de l'expression du SST6-2 chez <i>K. pneumoniae</i> CH1157.....	126
3. Matériel et méthodes	128
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	134
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	145
ANNEXES	172

Liste des abréviations

AAA+	ATPases Associées à diverses Activités cellulaires
Acyl-HSL	Acyl-Homosérolactone
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine Diphosphate
AGCC	Acides Gras à Chaines Courtes
AI-x	Auto-inducteurs de type x
AIM2	Absent In Melanoma 2
Akt	Protéine kinase B
AMP	Adénosine Monophosphate
AMPc	AMP cyclique
ANMV	Cocktail d'antibiotiques (Ampicilline, Néomycine, Métronidazole et Vancomycine)
Ap	Ampicilline
APEC	<i>E. coli</i> pathogène aviaire
ARCOL	Artificial colon
ARN	Acide Ribonucléique
ARNr	ARN ribosomal
ATP	Adénosine Triphosphate
ATPase	Adénosine Triphosphatase
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Paire de base
BP	Baseplate Complex
CG	Clonal Group
ClpV	Caseinolytic peptidase V
Cm	Chloramphénicol
CRP	AMPc Receptor Protein
Cryo-EM	Cryomicroscopie électronique
Ct	Cycle threshold
CT	Toxine responsable du choléra
Dam	ADN méthyltransférase
DBB	DNA Binding Buffer
DEPC	Diéthyl pyrocarbonate
D-Glu-mDAP	Liaison D-Glucose-acide méso-diaminopimélique
DL₅₀	Dose Létale 50
DNAse	Désoxyribonucléase
DO	Densité Optique
Dot	Defect in Organelle Trafficking
DSS	Dextran Sodium Sulfate
DUF	Domain of Unknown Function
EAEC	<i>E. coli</i> entéroaggrégatifs
Eag	Effector-associated gene
EHEC	<i>E. coli</i> entérophémorragiques
ETEC	<i>E. coli</i> entérotoxinogènes

ESKAPE	Groupe de pathogènes incluant : <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumanii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Enterobacter</i>
ESX	Early Secretory antigen 6 kDa
FRT	Flippase Recognition Target
Fur	Ferric Uptake Regulator
GF	Germ Free
GFP	Green Fluorescent Protein
GlcNAc	Acide N-acétyl-glucosamine
GSP	General Secretion Pathway
GTPase	Guanosine Triphosphatase
γTuRC	γ-tubulin Ring Complex
Hcp	Hemolysin Coregulated Protein
Hcp-ETs	Hcp with C-terminal Extension Toxins
H-NS	Histone-like Nucleoid-Structuring
IAHP	IcmF-associated homologous protein
ICE	Integrative Conjugative Elements
Icm	Intracellular replication
IgX	Immunoglobuline X
IL-X	Interleukine-X
ImpA	Inner Membrane Protein A
IP	Iodure de Propidium
Jnk	c-Jun N-terminal kinase
KO	Knock-Out
LB	Lysogeny Broth
LPS	Lipopolysaccharides
LT	Entérotoxine thermolabile
MAPKinase	Mitogen-Activated Protein Kinase
MC	Membrane Complex
mDAP-D-Ala	Liaison acide méso-diaminopimélique-D-Alanine
MEM	Eagle's Minimum Essential Medium
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MICI	Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin
MLST	Multi Locus Sequence Typing
MurNAc	Acide N-acétyl-muramique
NAD(P)+	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate sous sa forme oxydée
NF-κB	Nuclear Factor-Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLRP	<i>NOD-, LRR-, and pyrin domain-containing</i>
Nod	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
OB-fold	Oligosaccharide/oligonucleotide-binding
Oligo-MM¹²	Oligo-Mouse-Microbiota ¹²
OmpA	Outer Membrane Protein A
O/N	Overnight
PAAR	Proline-Alanine-Alanine-Arginine
PAI	Pathogenicity Associated Islands
Pal	Peptidoglycan-associated lipoprotein
PBB	Protein Binding Buffer
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank

Pi3k-Akt	Phosphoinositol-3-kinase Akt
Pld	Phospholipase de type D
PRR	Pattern Recognition Receptor
qPCR	PCR quantitative
QS	Quorum Sensing
RAISIN	Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales
RegIIy	Regenerating islet-derived protein III-gamma
Rhs	Recombination Hot-Spot
ROS	Espèces réactives à l'oxygène
RT	Reverse Transcription
SDS	Dodécylsulfate de sofium
SDS-PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
Sec	General Secretory pathway
SLT	Soluble Lytic murein Transglycosylase
SPI	Salmonella Pathogenicity Island
SRP	Signal Recognition Particle
SSTx	Système de sécrétion de type x
ST	Sequence Type
STEC	<i>E. coli</i> producteurs de Shiga-toxines
TagX	Tss-associated genes
Tae	Type VI amidase effector
Tai	Type VI amidase immunity
Tat	Twin-arginine translocation
Tas	Type VI effector (p)ppApp Synthetase
Tde	Type VI DNase effector
Tge	Type VI glycoside hydrolase effector
Tgi	Type VI glycoside hydrolase immunity
Tke	Type VI <i>Klebsiella</i> effector
Tlde	Type VI L-D transpeptidase effector
Tle	Type VI lipase effector
Tli	Type VI lipase immunity
Tne	Type VI NADase effector
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alpha
Tre	Type VI ADP-Ribosyltransferase effector
Tri	Type VI ADP-Ribosyltransferase immunity
Tse	Type VI exported
Tsl	Type VI secretion dynamic localization protein A
TssX	Type VI Secretion X
TTR	Transthyréline-like
UFC	Unité Formant Colonie
UPEC	<i>E. coli</i> uropathogènes
Vas	Virulence-Associated Secretion
VgrG	Valine-Glycine Repeat Protein G
VRE	Entérocoques Vancomycines-Résistants
WGS	Whole-Genome Sequencing
ZO	Zonula Occludens

Index des illustrations

Liste des figures

Figure 1 : Taxonomie du genre *Klebsiella*.

Figure 2 : Liste des microorganismes les plus fréquemment isolés lors d'infections nosocomiales en France (2017).

Figure 3 : Comparaison des infections causées par les différentes souches de *K. pneumoniae*.

Figure 4 : Chronologie d'utilisation des antibiotiques et d'apparition des résistances antibiotiques chez *K. pneumoniae*.

Figure 5 : Répartition géographique des isolats hypervirulents de *K. pneumoniae* : zones endémiques et sporadiques.

Figure 6 : Prévalence des facteurs de virulence et des gènes de résistances aux antibiotiques parmi différents groupes clonaux de *K. pneumoniae*.

Figure 7 : Facteurs de virulences principaux retrouvés chez les souches classiques et hypervirulentes de *K. pneumoniae*.

Figure 8 : Etapes de formation d'un biofilm.

Figure 9 : Tolérance et résistance aux molécules antibiotiques au sein d'un biofilm.

Figure 11 : Variations de composition du microbiote intestinal le long du tractus GI.

Figure 12 : Rôles du microbiote intestinal.

Figure 13 : Production de butyrate par le microbiote intestinal et rôles bénéfiques associés.

Figure 14 : Passage de l'état homéostatique à l'état dysbiotique du microbiote intestinal.

Figure 15 : Facteurs influençant la composition et les fonctions du microbiote intestinal.

Figure 16 : Concept de résilience du microbiote intestinal.

Figure 17 : Perturbation du métabolisme du butyrate par les colonocytes et expansion des *Enterobacteriaceae*.

Figure 18 : Description du modèle murin de colite ulcéreuse avec traitement au Dextran Sodium Sulfate (DSS).

Figure 19 : Principe d'action de la colibactine chez les *E. coli* pks positifs.

Figure 20 : Dynamique du microbiote sous l'action de stress environnementaux : introduction au concept de clusters bactériens inter-exclusifs.

Figure 21 : Effet mémoire du microbiote intestinal de souris conditionné par l'infection.

Figure 22 : *C. albicans* et *K. pneumoniae* agissent de concert pour agraver l'inflammation intestinale dans un modèle de colite induite au DSS.

Figure 23 : Illustration des phénomènes de sécrétion, translocation et export des protéines chez les bactéries Gram positif et Gram négatif.

Figure 24 : Le système de translocation Sec chez les bactéries.

Figure 25 : Le système de translocation Tat chez les bactéries.

Figure 26 : Les différents systèmes de sécrétion chez les bactéries Gram négatif.

Figure 27 : Principe de fonctionnement du système de sécrétion de type II (SST2).

Figure 28 : Principe de fonctionnement du système de sécrétion de type IV (SST4).

Figure 29 : Organisation génomique du SST6.

Figure 30 : Organisation structurale du SST6.

Figure 31 : Homologie structurale entre le bactériophage T4 et le SST6.

Figure 32 : Visualisation de la structure du complexe membranaire par cryotomographie.

Figure 33 : Assemblage du complexe membranaire.

Figure 34 : Ancrage du complexe membranaire au peptidoglycane.

Figure 35 : Interactions entre les composants du complexe membranaire et de la plaque de base.

Figure 36 : Modèle d'assemblage de la plaque de base.

Figure 37 : Structure tubulaire et « roue dentelée » TssBC vue en microscopie électronique.

Figure 38 : Représentation schématique des différents modèles de polymérisation de la queue contractile.

Figure 39 : Arrêt de la polymérisation de la queue contractile en fonction du diamètre de la cellule : interaction TssA-TagA.

Figure 40 : Visualisation en microscopie électronique du SST6 sous sa conformation étendue et contractée.

Figure 41 : Action de l'ATPase AAA+ ClpV et désassemblage de la queue contractile.

Figure 42 : Représentation schématique de l'assemblage et de la mécanique de sécrétion du SST6.

Figure 43 : Représentation schématique du chargement des effecteurs du SST6.

Figure 44 : *B. pseudomallei* facilite son internalisation grâce à VgrG5 de manière SST6 dépendante.

Figure 45 : VgrG2b, PldA et PldB sont interdépendants et jouent un rôle complémentaire dans l'internalisation de *P. aeruginosa*.

Figure 46 : Effecteurs sécrétés par le SST6 H1, H2 et H3 chez *P. aeruginosa*.

Figure 47 : Représentation schématique du peptidoglycane et activité enzymatique des amidases (Tae) et peptidoglycane hydrolases (Tge).

Figure 48 : Distribution phylogénétique des effecteurs de type phospholipase au sein des bactéries Gram négatif et organisation génomique.

Figure 49 : Différents modes de clivage des phospholipides selon le type de phospholipase.

Figure 50 : Antagonisme médié par le SST6 au sein du microbiote intestinal.

Figure 51 : Transfert horizontal de gènes et acquisition de matériel génétique médié par le SST6 chez *V. cholerae*.

Figure 52 : Acquisitions d'ions Zn²⁺ médié par le SST6-4 de *B. thailandensis*.

Figure 53 : Régulation par le fer du SST6 chez *E. coli* EAEC : le répresseur Fur.

Figure 54 : Exemple de régulation médiée par un système à deux composants : le système PhoPQ.

Figure 55 : Mécanisme d'inhibition de la transcription par H-NS.

Figure 56 : Observation des structures membranaires de *E. coli* DH5α/pBAD33-ssOmpA-tle1 et *E. coli* DH5α/pBAD33-ssOmpA au microscope électronique à transmission.

Figure 57 : Modélisation 3D de la phospholipase Tle1 du SST6-1 de CH1157 et de son site actif.

Figure 58 : Effet cytotoxique de la phospholipase Tle1 en système hétérologue chez *E. coli* DH5α.

Figure 59 : Effet cytotoxique de la phospholipase Tle1 en intraespèce chez *K. pneumoniae* CH1476 et CH1476-ΔTA.

Figure 60 : Représentation schématique des régions promotrices et potentiels sites de fixations de régulateurs transcriptionnels du SST6-1 et SST6-2.

Figure 61 : Identification des régulateurs transcriptionnels du SST6-1 de la souche CH1476 par analyse « promoter capture ».

Figure 62 : Evaluation de l'expression relative du SST6-1 et -2 en différentes conditions de stress par RT-qPCR.

Figure 63 : Modélisation 3D de la phospholipase Tke du SST6-2 de CH1157 et de ses domaines respectifs.

Figure 64 : Effet cytotoxique de l'effecteur Tke en système hétérologue chez *E. coli* DH5α.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Nomenclature conservée des gènes du SST6.

Tableau 2 : Souches bactériennes utilisées dans cette étude.

Tableau 3 : Plasmides utilisés dans cette étude.

Liste des annexes

Annexe 1 : Récapitulatif des conditions testées en RT-qPCR et explication des choix réalisés.

Annexe 2 : Couple d'amorces utilisés dans cette étude.

Annexe 3 : Quantification de la biomasse de biofilm et du nombre de CFU par *K. pneumoniae* CH1476 et les différents mutants du SST6 utilisés dans cette étude.

Résumé

Klebsiella pneumoniae est un pathogène opportuniste multi-résistant aux antibiotiques, responsable d'infections liées aux soins, souvent consécutives à la colonisation du tractus digestif. Les processus de formation de biofilm sont bien décrits pour ce pathogène, mais les interactions compétitives au sein de communautés microbiennes complexes, comme le microbiote intestinal, restent mal comprises. Les systèmes de sécrétion de type VI (SST6) sont de véritables seringues moléculaires, et sont retrouvés chez plus d'un quart des Protéobactéries. Ils sont impliqués dans la sécrétion et l'injection d'effecteurs toxiques dans des cellules procaryotes et/ou eucaryotes par contact direct, et leur expression est liée à différents stress environnementaux. Le SST6 a été récemment décrit dans des clones hypervirulents de *K. pneumoniae* où il est impliqué dans la virulence et la compétition interbactérienne, mais peu de données concernent les souches classiques de *K. pneumoniae* (cKp). L'objectif de ce travail était d'analyser la prévalence du SST6 et de ses effecteurs dans différents génomes du genre *Klebsiella spp*, d'étudier son rôle dans la colonisation intestinale ainsi que sa régulation transcriptionnelle dans une souche clinique de référence, *K. pneumoniae* CH1157.

Une approche *in silico* a permis d'identifier la présence d'un à quatre opérons SST6 dans 427 génomes de *Klebsiella*, avec une forte prévalence au sein de l'espèce *K. pneumoniae*, indépendamment de l'origine géographique des souches. La présence de deux opérons (SST6-1 et -2) a été mise en évidence dans le modèle d'étude CH1157, contenant respectivement deux gènes codant des effecteurs de type phospholipase (*tle1*) et endopeptidase (*tke*), également identifiés dans d'autres génomes de *K. pneumoniae*. L'expression périplasmique de Tle1 et Tke en système hétérologue chez *E. coli* DH5 α altère la capacité de croissance ainsi que la perméabilité membranaire, ce qui suggère une activité antibactérienne médiée par les effecteurs du SST6 en lien avec un environnement stressant tel que le tractus gastro-intestinal.

L'impact du SST6 sur le microbiote a été étudié dans un modèle murin de colonisation gastro-intestinale avec la souche CH1157 sauvage versus des mutants isogéniques invalidés pour le SST6-1 ($\Delta tssB$ et $\Delta clpV$). Les mutants ont montré une moindre capacité de colonisation du tractus gastro-intestinal à long terme par rapport à la souche sauvage. L'analyse des microbiotes fécaux par séquençage à haut débit de l'ADNr 16S a mis en évidence le rôle du SST6-1 dans la dysbiose du microbiote intestinal 50 jours post-infection, avec un impact sur sa richesse, sa diversité et sa résilience. La présence du SST6-1 est corrélée à une absence spécifique des membres de la famille des Oscillospiraceae. L'activité antibactérienne du SST6 envers des genres ou espèces de cette famille reste cependant à déterminer.

La régulation de l'expression des gènes codant les SST6-1 et -2 est un aspect complexe soulevé dans cette étude. Des sites de fixation pour les régulateurs transcriptionnels ArgR et Fnr ont été identifiés au niveau de la région promotrice du SST6-1, à la fois *in silico* et *in vitro*. Les conditions de régulation de l'expression des SST6 dans les souches cKp restent à élucider mais pourraient faire intervenir des stress rencontrés au niveau du tractus gastro-intestinal tels que la présence d'acides biliaires ou encore le contact de cellules épithéliales.

L'ensemble de ces résultats souligne un rôle majeur du SST6 chez *K. pneumoniae* dans les interactions hôte-pathogène. Il apparaît indispensable de continuer les investigations de ce nouveau facteur de pathogénicité chez *K. pneumoniae* afin de mieux comprendre son implication dans le processus physiopathologique et permettre le développement de stratégies thérapeutiques innovantes à long terme.

Abstract

Klebsiella pneumoniae is an opportunistic pathogen with multiple antibiotic resistance, responsible for hospital-acquired infections consecutively to intestinal microbiota colonization. If biofilm formation processes are well described for this pathogen, competitive interactions within complex microbial communities, such as intestinal microbiota, remain poorly understood. Type VI secretion systems (T6SSs) act as molecular syringes and are found in more than 25% of Proteobacteria. T6SSs are involved in secretion and injection of toxic effectors into adjacent prokaryotic and/or eukaryotic cells through direct contact and their expression is dependent of many environmental stressors. Such a system has been recently described in hypervirulent *K. pneumoniae* clones as implied in virulence and bacterial warfare but remains poorly described in classical *K. pneumoniae* strains (cKp). The aim of this study was to investigate the prevalence of the T6SS and its effectors among different *Klebsiella* spp. genomes and to understand its role in intestinal colonization and its transcriptional regulation in a classical clinical isolate, *K. pneumoniae* CH1157.

An *in silico* approach identified the presence of one to four T6SS related clusters in 427 *Klebsiella* genomes, associated with a high prevalence in *K. pneumoniae* species, independently of the geographical origin of the strains. Two T6SS related clusters were highlighted in CH1157 strain (T6SS-1 and -2), harboring a phospholipase (*tle1*) and an endopeptidase (*tke*) encoding gene, respectively. The *tle1* and *tke* genes were also identified in other *K. pneumoniae* genomes. The periplasmic Tle1 and Tke expression *via* site-directed expression in *E. coli* DH5 α impaired bacterial growth and membrane permeability suggesting that these effectors impair the bacterial capacity to survive in a stressor environment such as the intestinal tract.

The impact of the T6SS on microbiota has been investigated in a murine gastrointestinal colonization model, where streptomycin pre-treated mice were inoculated with either the CH1157 wild-type strain or its derivative T6SS-1 mutants ($\Delta tssB$ and $\Delta clpV$). T6SS-1 mutants were drastically impaired in their long-term gut colonization ability in comparison to the WT strain. High-throughput 16S rDNA sequencing of fecal microbiota revealed that T6SS-1 is implied in gut dysbiosis 50 days post-infection, associated with decreased richness, diversity and resilience capacity. T6SS-1 was also correlated with specific absence of members of Oscillospiraceae family. The antibacterial activity of the T6SS towards genus or species belonging to this family remains to be determined.

T6SS-1 and -2 genes expression regulation is a complex aspect underlined in this study. Potential binding sites for ArgR and Fnr transcriptional regulators were both identified *in silico* and *in vitro* in the T6SS-1 promoter region. Specific conditions leading to T6SS expression in cKp remains to be elucidated but could implied environmental stressors, such as those found in gastrointestinal tract like bile salts or epithelial cell contact.

Taken together, these results highlighted a major role of the T6SS in *K. pneumoniae* host-pathogen interactions. Further investigation is needed to better understand the implication of this newly identified virulence factor of *K. pneumoniae* in pathophysiological process and to allow the development of long-term therapeutic strategies.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE



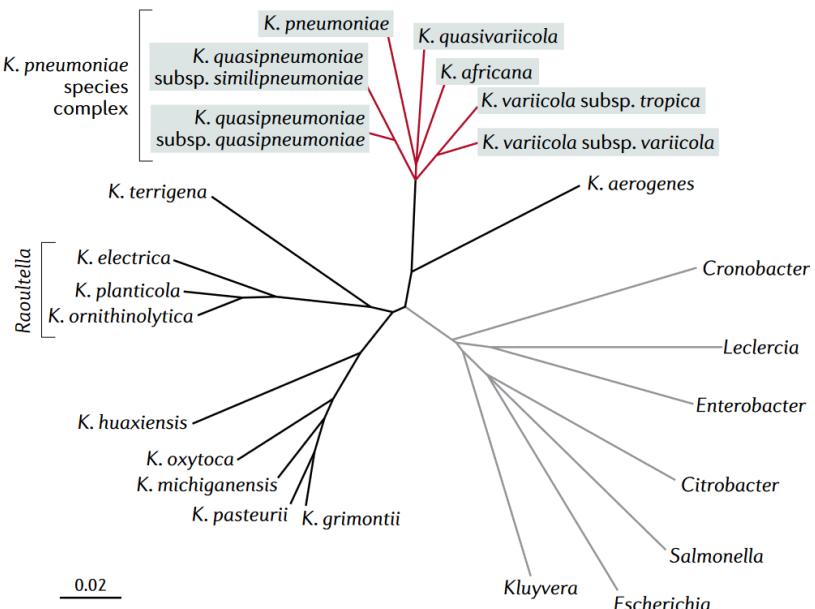


Figure 1. Taxonomie du genre *Klebsiella*. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse du génome complet des différentes espèces du genre *Klebsiella*. Le complexe d'espèces *K. pneumoniae* (**branches rouges / haut**) se distingue des autres espèces du genre *Klebsiella* et *Raoultella* (**branches noires**) et de la famille des Enterobacteriaceae (**branches gris clair**). L'échelle représente l'estimation moyenne de distances nucléotidiques entre les espèces (D'après Wyres et al. 2020).

PARTIE 1 : *Klebsiella pneumoniae*

I. *Klebsiella pneumoniae* : de la pathogénicité à la virulence

1. Taxonomie

1.1. Classification du genre *Klebsiella*

Les bactéries du genre *Klebsiella* sont classées au sein de la famille des entérobactéries (*Enterobacteriaceae*). Le terme « *Klebsiella* » en tant que nom de genre fut initialement donné en 1885 par Trevisan en hommage au microbiologiste allemand Edwin Klebs. Il supplanta le terme jusque-là utilisé, de « bacille de Friedländer » apparu en 1882, attribué au pathologiste et microbiologiste allemand Carl Friedländer (Friedlaender, 1882). Ce sont des bacilles Gram négatif à bouts ronds, encapsulés, non-mobiles, décarboxylant la lysine et utilisant la voie fermentaire des acides mixtes *via* la production de 2-3 butanediol mise en évidence par le test de Voges Proskauer (Podschun and Ullmann, 1998). Sur la base de l'identification de ces caractères biochimiques, différentes espèces du genre *Klebsiella* ont été décrites.

La première classification du genre *Klebsiella* a été réalisée sur la base des infections engendrées, avec trois principales espèces, à savoir *K. pneumoniae*, *K. ozaneae* et *K. rhinoscleromatis*. Cette classification n'a cessé d'évoluer en parallèle de l'évolution des outils taxonomiques et informatiques. De fait, quatre nouvelles espèces ont complété la taxonomie du genre *Klebsiella* entre les années 1980 et 1990, avec *K. terrigena*, *K. ornithinolytica*, *K. planticola* et *K. trevisanii* (maintenant regroupée avec *K. planticola* du fait de leur forte homologie génomique). La classification telle que nous la concevons à l'heure actuelle reste encore nation-dépendante, mais suit globalement la classification d'Ørskov dans les pays européens (Podschun and Ullmann, 1998). Celle-ci s'est cependant complexifiée avec l'apparition de nouvelles espèces, implémentée notamment par les techniques de Whole-Genome Sequencing (WGS), permettant la mise en évidence du complexe d'espèces *K. pneumoniae* d'une part, regroupant plusieurs espèces voisines (*K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae*, *K. quasivariicola*, *K. variicola* et *K. africana*), et les autres membres du genre *Klebsiella* d'autre part (Wyres et al., 2020) (**Figure 1**).

1.2. Classification de l'espèce *K. pneumoniae*

D'un point de vue génomique, l'identification de « séquences types » (STs) permet la discrimination de sous-populations au sein de l'espèce *K. pneumoniae*, définies initialement par la variation allélique de 7 gènes conservés (*mdh*, *infB*, *tonB*, *gapA*, *phoE*, *pgi*, et *rpoB*) (Multi Locus Sequence Typing (MLST)) (Diancourt *et al.*, 2005; Paczosa and Mecsas, 2016). Ce premier schéma d'identification a ensuite été supplanté par l'analyse du core génome MLST (cgMLST), plus stringente, permettant l'assignation taxonomique de génomes similaires sur la base du génotypage de 694 gènes du core génome (Bialek-Davenet *et al.*, 2014). Les différents clones appartenant à l'espèce *K. pneumoniae* ont donc été regroupés en « groupes clonaux » (« Clonal Groups » ou CGs en anglais) désignant des sous populations partageant un ancêtre commun récent. Ainsi sont apparues des sous-populations majoritaires dites « à problèmes » du fait de leur caractère multi-résistant aux antibiotiques et / ou hypervirulent, à l'origine d'infections humaines, comme le clone CG258 porteur du gène *kpc* codant une carbapénémase (Paczosa and Mecsas, 2016; Long *et al.*, 2017).

2. Epidémiologie

2.1. Une bactérie adaptée à tous les environnements

Les bactéries du genre *Klebsiella* sont dites ubiquitaires et donc retrouvées dans plusieurs niches écologiques. Les eaux, notamment de surface, sont des lieux de prolifération pour *Klebsiella spp.* (eaux de réservoirs, stations d'épurations, mers, effluents industriels) avec une prédominance des espèces *K. pneumoniae* et *K. oxytoca* (Bagley and Seidler, 1978; Bagley, 1985; Edberg, 1986). Les sols, et notamment les sols pollués, représentent également un habitat viable pour *K. pneumoniae* (Bagley, 1985; Barbier *et al.*, 2020). Les plantes ont été également identifiées comme étant des réservoirs pour *Klebsiella spp.* (Brown and Seidler, 1973; Falomir *et al.*, 2010). Enfin, *K. pneumoniae* est retrouvée en tant que commensale du microbiote de plusieurs hôtes animaux domestiqués ou non. Ainsi *K. pneumoniae* est retrouvée au niveau du microbiote intestinal du bétail (vaches, chevaux, porcs), du chien mais aussi des animaux sauvages (oiseaux, poissons, mollusques, insectes) (Wyres and Holt, 2018). La contamination des denrées alimentaires animales ou végétales, notamment celles destinées à la consommation humaine, constitue donc une source de

Micro-organisme	PART RELATIVE		
	n	%	IC95 %
<i>Escherichia coli</i>	904	23,59	[21,89-25,37]
<i>Staphylococcus aureus</i>	601	13,83	[12,39-15,41]
<i>Enterococcus faecalis</i>	288	6,50	[5,61-7,52]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	285	6,28	[5,24-7,51]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	266	5,60	[4,80-6,52]
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	251	5,39	[4,48-6,47]
<i>Enterobacter cloacae</i>	185	3,78	[3,02-4,72]
<i>Proteus mirabilis</i>	130	2,92	[2,37-3,58]
<i>Clostridium difficile</i>	83	2,31	[1,77-3,00]
<i>Candida albicans</i>	67	1,53	[1,13-2,07]
<i>Enterococcus faecium</i>	66	1,51	[1,15-2,00]
Streptocoques, autre espèce	51	1,39	[0,98-1,96]
<i>Citrobacter koseri</i> [ex. <i>diversus</i>]	49	1,34	[0,92-1,94]
<i>Klebsiella oxytoca</i>	44	1,22	[0,73-2,03]
Staphylocoque coagulase négative, autre	66	1,11	[0,76-1,60]
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	52	1,02	[0,72-1,45]
<i>Enterobacter aerogenes</i>	42	0,96	[0,61-1,49]
Autre <i>Pseudomonas</i> spp. et apparentés	35	0,92	[0,61-1,37]
<i>Morganella</i> spp.	48	0,83	[0,60-1,16]
Autres	709	16,30	
TOTAL	4 232	100,00	

Figure 2. Liste des microorganismes les plus fréquemment isolés lors d'infections nosocomiales en France (2017). Sur les 4232 cas recensés d'infections acquises à l'hôpital en France en 2017, *K. pneumoniae* a été isolée chez 266 patients, représentant une part relative de 5,6% (D'après l'Enquête Nationale de Prévalence des Infections Nosocomiales, 2017).

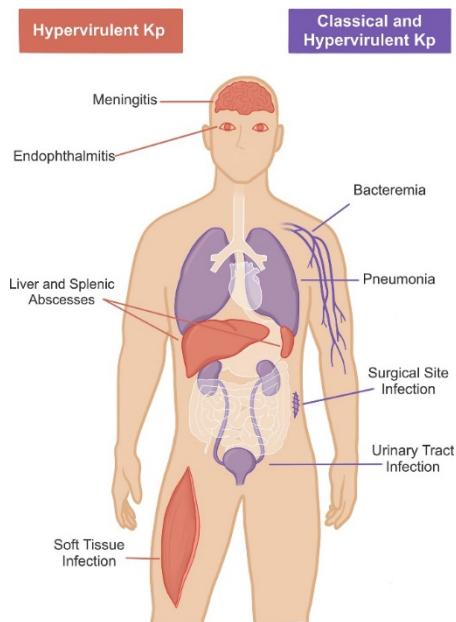


Figure 3. Comparaison des infections causées par les différentes souches de *K. pneumoniae*. Par opposition aux souches classiques, les souches hypervirulentes provoquent des infections communautaires prenant la forme d'abcès hépatiques, d'endophtalmies, de méningites ou encore d'infections des tissus mous (**Gauche / Rouge**). Dans des cas plus fréquents d'infections acquises à l'hôpital, les souches à la fois classiques (englobant les multi-résistantes) et hypervirulentes, peuvent engendrer chez l'Homme des bactériémies, des infections urinaires, des pneumonies ou encore des infections de plaies opératoires (**Droite / Violet**) (D'après Gonzalez Ferrer et al., 2021).

transmission à l'Homme. Ce phénomène peut conduire à une colonisation de l'intestin et potentiellement provoquer différentes formes cliniques infectieuses.

2.2. Une bactérie commensale et/ou pathogène ?

Chez l'Homme, *K. pneumoniae* peut coloniser les épithéliums de la peau, de la bouche, et les muqueuses des voies respiratoires et du tractus gastro-intestinal, mais le microbiote intestinal constitue le principal lieu de colonisation asymptomatique. Ce portage chez l'Homme varie en fonction des régions géographiques, de l'âge, et d'un éventuel contact avec un environnement contaminé, notamment hospitalier. La prévalence de colonisation est estimée entre 4 et 25% de la population, avec cependant des taux de portages supérieurs (62.1%) dans les pays d'Asie de l'Est notamment (Lin *et al.*, 2012; Wyres *et al.*, 2020).

En France, *K. pneumoniae* a été identifiée comme responsable de 5.6% des cas d'infections nosocomiales, la classant au 5^e rang des bactéries les plus fréquemment retrouvées dans le cas d'infections acquises à l'hôpital d'après l'Enquête Nationale de Prévalence effectuée par le RAISIN (RAISIN, 2017) (**Figure 2**). De plus, *K. oxytoca* étant à l'origine de 1.2% des infections nosocomiales dans cette même étude, le genre *Klebsiella* est donc le 3^e microorganisme causant des infections nosocomiales en France. Plusieurs études ont par ailleurs montré la relation de cause à effet entre portage intestinal asymptomatique de *K. pneumoniae* et survenue d'une infection, faisant de cette bactérie un pathogène dit « opportuniste », en lien avec le terrain immunodéprimé des patients (Gorrie *et al.*, 2017; Pérez-Nadales *et al.*, 2022; Meatherall *et al.*, 2009).

3. Infections nosocomiales vs infections communautaires

K. pneumoniae est responsable d'infections liées aux soins et notamment acquises à l'hôpital (infections nosocomiales) causant ainsi des pneumonies, des infections urinaires et cutanées et des bactériémies (Podschun and Ullmann, 1998). Ces infections représentent la majorité des infections à *K. pneumoniae* et sont dues à des souches dites « classiques » généralement multi-résistantes, par opposition aux souches « hypervirulentes » pouvant causer des infections communautaires chez des personnes immunocompétentes (**Figure 3**).

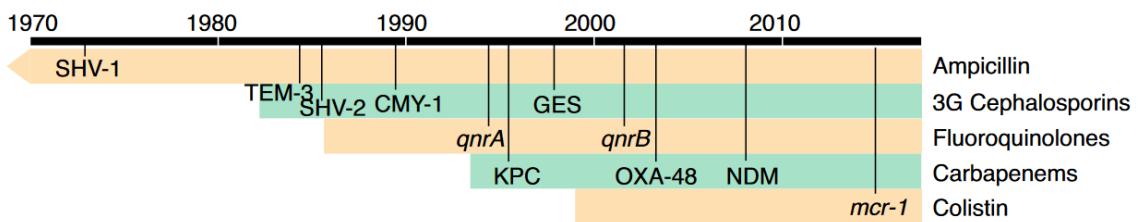


Figure 4. Chronologie d'utilisation des antibiotiques et d'apparition des résistances antibiotiques chez *K. pneumoniae*. L'utilisation des différentes classes d'antibiotiques (β -lactamines : ampicilline, céphalosporines de 3^e génération, carbapénèmes ; Fluoroquinolones et Polymyxines : colisitine), correspond aux barres de couleurs jaunes et vertes, dont le début commence aux extrémités gauches. L'apparition des premiers isolats résistants à chaque classe d'antibiotiques et les différentes enzymes (majuscules) ou gènes (minuscules et italiques) responsables des mécanismes de résistance sont reportés par les traits verticaux sur la frise. A noter l'absence sur cette figure de CTX-M, une autre β -lactamase majeure détectée chez *K. pneumoniae* vers l'année 1990 (D'après Wyres and Holt, 2018).

3.1. Souches classiques et antibio-résistance

Les infections à *K. pneumoniae* sont considérées comme un problème majeur de santé notamment en raison de la capacité de cette bactérie à résister à plusieurs familles d'antibiotiques ; elle fait partie du groupe de pathogènes ESKAPE (Gram positif : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* et Gram négatif : *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumanii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter*), genres et espèces les plus fréquemment retrouvés parmi les souches cliniques multi-résistantes (Wyres and Holt, 2018; Wyres *et al.*, 2020). Cette antibio-résistance est à la fois naturelle, conférée par la présence de gènes chromosomiques - *K. pneumoniae* est intrinsèquement résistante à l'ampicilline de par la présence du gène chromosomal *bla-SHV1* codant une β-lactamase - mais aussi acquise, par transfert horizontal d'éléments génétiques mobiles (larges plasmides conjuguatifs et transposons) porteurs de gènes de résistances à plusieurs antibiotiques (β-lactamases à spectre étendu, carbapénémases, résistance aux fluoroquinolones) (Martin and Bachman, 2018). Les souches de *K. pneumoniae* capables de résister à au moins 3 classes d'antibiotiques en plus de l'ampicilline sont donc considérées comme « multi-résistantes » (Wyres *et al.*, 2020; Gonzalez-Ferrer *et al.*, 2021). De plus, l'apparition séquentielle des différentes générations d'antibiotiques (céphalosporines de 3^e génération, fluoroquinolones, polymyxines) a vu l'émergence parallèle de résistances aux antibiotiques chez *K. pneumoniae* (**Figure 4**). La synthèse de β-lactamases à spectre étendu (SHV-2, TEM, CTX-M) a ainsi été décrite initialement au sein de cette espèce (Sirot *et al.*, 1987, 1988; Wyres and Holt, 2018). *K. pneumoniae* synthétise également des β-lactamases clivant les carbapénèmes : des métallo-carbapénémases (NDM) ainsi que des sérines carbapénémases (KPC et OXA-48) (Grall *et al.*, 2011). La responsabilité de *K. pneumoniae* dans les infections à bactéries carbapénèmes résistantes est souvent engagée, et celle-ci varie en fonction des régions géographiques, avec une surreprésentation dans les pays de l'Europe de l'Est et les pays asiatiques, où des études récentes rapportent des taux de résistance aux carbapénèmes de l'ordre de 90% parmi des souches cliniques de *K. pneumoniae* (Wang *et al.*, 2022).

L'utilisation importante d'antibiotiques au sein des unités de soins reste le facteur prédominant dans l'apparition des colonisations gastro-intestinales et la survenue des infections à *K. pneumoniae*. Plusieurs voies de transmission ont été identifiées comme la

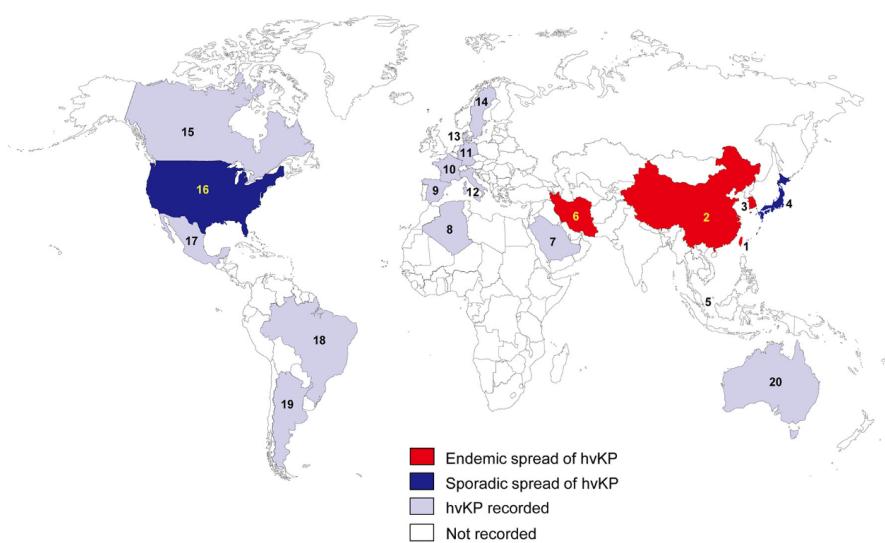


Figure 5. Répartition géographique des isolats hypervirulents de *K. pneumoniae* : zones endémiques et sporadiques. La présence des souches de *K. pneumoniae* hypervirulentes est différemment distribuée en fonction des régions du monde. En rouge, les zones endémiques rapportant plusieurs épidémies de *K. pneumoniae* hypervirulentes sont principalement retrouvées en Asie. Des cas sporadiques (non responsables d'épidémies) ont été rapportés dans d'autres pays, notamment aux USA (bleu foncé). Enfin, des cas isolés ont été identifiés en Europe de l'Ouest, Amérique du Sud et Océanie (bleu clair) (D'après Lee et al., 2017).

transmission manuportée par le personnel soignant ou encore la contamination de dispositifs médicaux invasifs (cathéters veineux, cathéters urinaires, endoscopes) (Gorrie *et al.*, 2017; Aumeran *et al.*, 2010; Podschun and Ullmann, 1998). Ces facteurs exogènes se combinent à la durée de séjour en unités de soins ainsi qu'aux facteurs de prédisposition de l'hôte : maladies cardio-vasculaires, diabète, immunodépression, cancers et alcoolisme (Kontopoulou *et al.*, 2019; Meatherall *et al.*, 2009).

En opposition aux souches multi-résistantes classiques causant des infections en milieu hospitalier, les souches hypervirulentes de *K. pneumoniae*, ne présentent généralement que peu de résistances aux antibiotiques mais elles sont munies de facteurs de pathogénicité spécifiques.

3.2. Souches hypervirulentes

Les souches de *K. pneumoniae* hypervirulentes causent des infections beaucoup plus sévères (méningites, endophthalmies, abcès du foie et de la rate, infections des tissus mous) et ce, même en l'absence de terrain de prédisposition (**Figure 3**). La première identification de souches hypervirulentes a été réalisée en 1986 lors de 7 cas d'endophthalmies sévères associées à une méningite (Liu *et al.*, 1986). La prévalence des isolats hypervirulents varie selon la zone géographique. Ces souches sont majoritairement retrouvées dans les pays d'Asie : Corée, Taiwan, Chine, Japon, Malaisie, Hong Kong, Singapour. En Corée en 2012, la prévalence globale de colonisation rectale par *K. pneumoniae* était de 21.1%, avec 4.6% de souches identifiées comme hypervirulentes (Chung *et al.*, 2012). En Chine, 31 à 38% des isolats cliniques identifiés comme *K. pneumoniae* étaient des souches hypervirulentes, et le taux de mortalité engendré par ces infections était estimé entre 4.5% et 31% (Martin and Bachman, 2018). Le fait d'être porteur d'une souche hypervirulente est un facteur de risque majeur vis-à-vis du développement d'une infection ultérieure à *K. pneumoniae* (Russo and Marr, 2019). Aux USA et en Europe de l'Ouest, certains cas sporadiques d'infections liées à des souches de *K. pneumoniae* hypervirulentes ont été recensés au début des années 2000. Ce nombre de cas est en constante augmentation mais est souvent lié à des voyages récents ou à des contacts avec des autochtones de pays asiatiques (Pomakova *et al.*, 2012; Ko, 2002) (**Figure 5**). Des séquences types spécifiques ont été attribuées aux clones hypervirulents en lien avec des infections disséminées, comme c'est le cas des clones ST23, ST57, ST86, ST375 ou encore

ST380. Ces clones ont en commun la production de capsule de type K1 ou K2, qui sont les deux sérotypes les plus retrouvés parmi les souches hypervirulentes (Lee *et al.*, 2017; Shon *et al.*, 2013).

Paradoxalement et jusqu'à présent, aucun test ni définition précise ne permettent la discrimination entre souches hypervirulentes et classiques (Lee *et al.*, 2017). La distinction repose sur la présence d'un ensemble de gènes et d'opérons propres aux souches hypervirulentes impliqués dans la pathogénicité (sidérophores spécifiques : aérobactine et salmochéline ; production importante de polysaccharides capsulaires), en plus des facteurs de pathogénicité synthétisés par l'ensemble des souches de *K. pneumoniae* (capsule polysaccharidique, lipopolysaccharides, sidérophores, structures de surfaces pili et fimbriae) (Russo *et al.*, 2018). La distinction entre les caractéristiques des souches hypervirulentes et des souches classiques, ainsi que les facteurs de pathogénicité spécifiquement produits par les souches hypervirulentes sont discutés plus amplement dans la revue « *From Klebsiella pneumoniae colonization to dissemination : an overview of studies implementing murine models* » en partie II.1. de ce mémoire (Joseph *et al.*, 2021).

Les souches hypervirulentes sont majoritairement plus sensibles aux antibiotiques que les souches classiques. Ces phénomènes restent encore mal compris, mais pourraient s'expliquer par une production de capsule polysaccharidique plus importante, limitant les transferts horizontaux de gènes (Lee *et al.*, 2017). En 2007, Fang *et al.*, identifient 177 isolats cliniques de *K. pneumoniae* considérés comme hypervirulents et montrent que 100% des isolats sont sensibles à plusieurs classes d'antibiotiques (carbapénème, céphalosporines de 3^e génération, et aminoglycosides) (Fang *et al.*, 2007). Cependant, l'émergence récente de nouvelles souches à la fois multi-résistantes et à virulence augmentée fait peser la crainte de survenue d'impasses thérapeutiques, avec des infections très sévères ne pouvant être traitées par les antibiotiques disponibles (Bialek-Davenet *et al.*, 2014; Holt *et al.*, 2015). Deux scénarios permettant d'expliquer cette convergence de phénotypes multi-résistants et hypervirulents sont envisagés : soit des souches hypervirulentes auraient acquis des gènes de résistance par transferts horizontaux, soit des souches multi-résistantes auraient acquis différents facteurs de pathogénicité spécifiques aux hypervirulentes (Wyres *et al.*, 2020). Cette dernière hypothèse serait privilégiée du fait de la grande plasticité de génomes des souches multi-résistantes qui seraient plus à même d'acquérir de nouveaux gènes *via* des

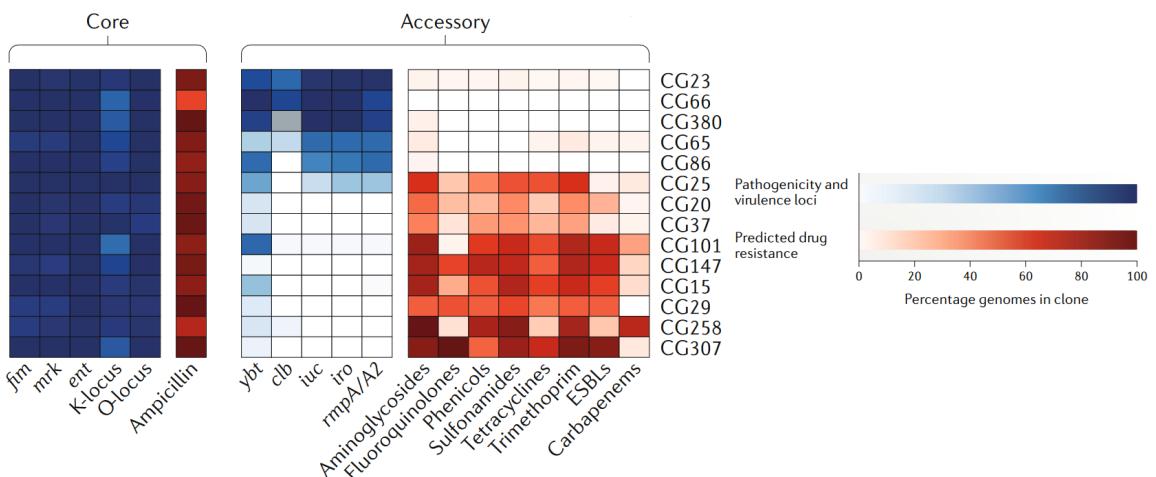


Figure 6. Prévalence des facteurs de virulence et des gènes de résistance aux antibiotiques parmi différents groupes clonaux de *K. pneumoniae*. Le génome core (**Gauche**) et le génome accessoire (**Droite**) de *K. pneumoniae* contiennent plusieurs facteurs de virulence (**Bleu**) (sidérophores (*ent*, *clb*, *iuc*, *iro*), production de capsule et de ses régulateurs (K-locus, *rmpA/A2*), LPS (O-locus), pili et fimbriae (*fim*, *mrk*)) et gènes de résistance (**Rouge**) avec une prévalence plus ou moins grande, selon les clones hypervirulents (CG23, CG25, CG65, CG66, CG86 et CG380) ou multi-résistants aux antibiotiques (CG15, CG20, CG29, CG37, CG147, CG101, CG258 et CG307) (**Adapté de Wyres et al., 2020**).

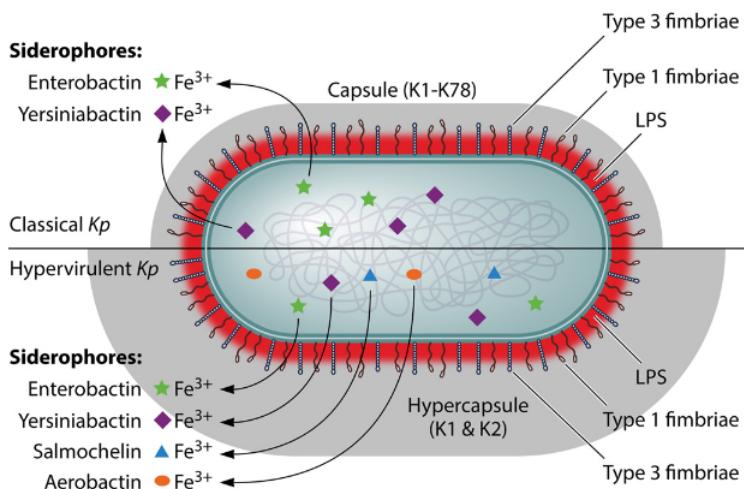


Figure 7. Facteurs de virulence principaux retrouvés chez les souches classiques et hypervirulentes de *K. pneumoniae*. *K. pneumoniae* entourée d'une capsule polysaccharidique qui lui confère résistance vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte. Dans sa forme hypervirulente, la production de matrice est augmentée (hyper-capsulation). Le LPS joue également dans la protection des cellules contre l'action des cellules du complément, mais aussi sur l'inflammation et l'inhibition de la réponse aux peptides anti-microbiens. Les sidérophores synthétisés par *K. pneumoniae* permettent la chélation du fer, ressource indispensable à sa croissance, depuis l'environnement direct de l'hôte. Certains types de sidérophores sont spécifiques aux souches hypervirulentes (aérobactine et salmochéline). Enfin, les fimbriae type I et III sont essentiels à l'adhésion aux surfaces épithéliales et directement à la formation de biofilm (**D'après Paczosa and Mecsas, 2016**).

transferts horizontaux. En effet, il a été montré qu'une souche résistante aux carbapénèmes de séquence type ST11 a été capable d'intégrer le plasmide pLVPK, retrouvé spécifiquement chez les souches hypervirulentes (Gu *et al.*, 2018). En 2019, Li *et al.* observaient une recrudescence de ces « superphénotypes » en Chine, où 20 clones à la fois hypervirulents et carbapénème-résistants ont été identifiés dans un même hôpital de la province de Hunan (Li, 2019).

4. Facteurs de pathogénicité de *Klebsiella*

Le pouvoir pathogène de *K. pneumoniae* est corrélé à la présence d'éléments du génome dit « core » (communs à toutes les espèces de *K. pneumoniae*) et « accessoires » (gènes spécifiques aux différentes souches de *K. pneumoniae*) (**Figure 6**). Si les pangénomes (core génome + génome accessoire) de *K. pneumoniae* sont de taille assez homogène (5 à 6 Mbp), entre 5000 et 6000 gènes (Gonzalez-Ferrer *et al.*, 2021; Martin and Bachman, 2018), seulement 1700 à 1800 gènes sont considérés comme appartenant au core génome pour un génome accessoire composé d'environ 3500 gènes (Holt *et al.*, 2015). Les génomes de *K. pneumoniae* codent de nombreux gènes impliqués dans la synthèse de plusieurs facteurs de pathogénicité, déjà largement décrits dans la littérature. Ceux-ci ont été répartis en 4 classes par Pacsoza et Mecsas : la capsule polysaccharidique (antigène K) (incluant aussi l'hyperproduction de capsule retrouvée chez les souches hypervirulentes), le lipopolysaccharide (antigène O), les sidérophores et les facteurs d'adhésion que sont les fimbriae et les pili (Paczosa and Mecsas, 2016) (**Figure 7**). L'ensemble de ces facteurs de pathogénicité sont présentés et détaillés dans la revue « *From Klebsiella pneumoniae colonization to dissemination : an overview of studies implementing murine models* » en partie II.1 (Joseph *et al.*, 2021). Par ailleurs, *K. pneumoniae* possède une autre propriété qui lui confère un avantage compétitif dans la survie et la pathogénicité : elle est capable de former des biofilms.

5. Capacité à former du biofilm

La formation de biofilm est un enchaînement de différentes étapes cruciales durant lesquelles les microorganismes forment une communauté en réponse à un ou des stress physiques, chimiques ou biologiques. Les étapes successives sont : l'adhésion initiale, la formation de micro-colonies, la maturation du biofilm et enfin la dispersion (Santos *et al.*,

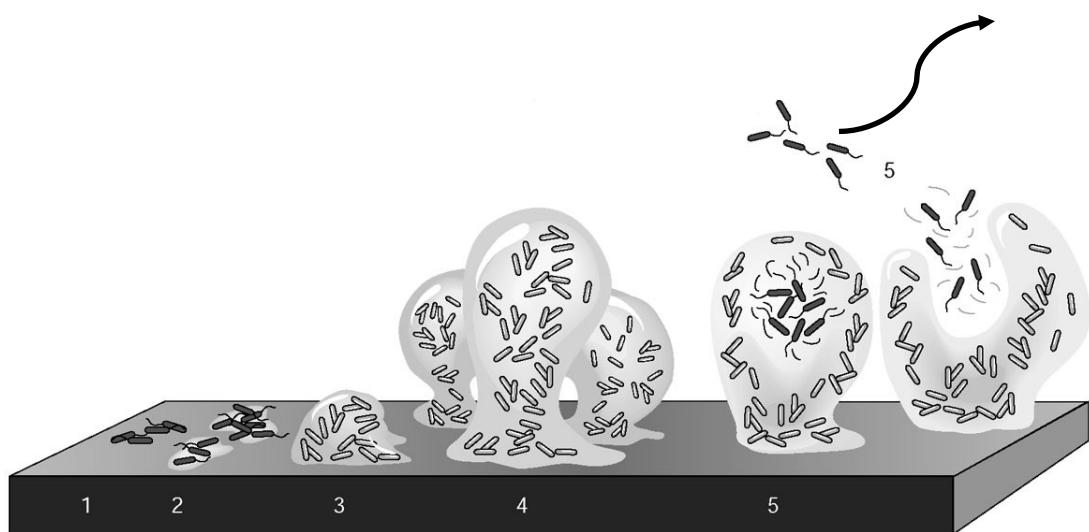


Figure 8. Etapes de formation d'un biofilm. La formation d'un biofilm commence par l'adhésion initiale des microorganismes aux surfaces qui est d'abord réversible (1) puis irréversible (2). L'adhésion irréversible précède l'initiation de la formation de microcolonies (3), débutant la synthèse de la matrice d'exopolysaccharides, structurant le biofilm, qui va ensuite subir une maturation (4) jusqu'à atteindre sa structure finale. Enfin, la dispersion (5) est un processus actif permettant à des bactéries détachées, ayant acquis un profil transcriptomique différent de l'état planctonique initial, d'aller coloniser d'autres sites pour ensuite ré-initier la formation d'un autre biofilm (*Adapté de Sauer et al., 2003*).

2018) (**Figure 8**). La capacité de *K. pneumoniae* à former des biofilms sur des surfaces biotiques et abiotiques est liée à la présence de divers facteurs de pathogénicité faisant partie du core génome, notamment la production de fimbriae (pili F, type I (Fim) type III (Mrk)) impliqués dans les étapes initiales d'adhésion (Balestrino *et al.*, 2008; Ghigo, 2001; Murphy *et al.*, 2013). Les pili de type I et de type III de *K. pneumoniae* sont également impliqués dans la formation de biofilm sur cathéters urinaires *in vivo* en modèle murin, avec un rôle prépondérant du pili type I dans la colonisation initiale du cathéter urinaire (Murphy *et al.*, 2013). Enfin, il a été montré que *K. pneumoniae* adopte des profils transcriptionnels spécifiques selon son mode de vie (planctonique, biofilm et bactéries dispersées). Par exemple, la dispersion du biofilm est métaboliquement coûteuse pour le pathogène et semble être liée à la réponse au stress notamment nutritif, *via* l'expression spécifique de gènes impliqués dans les systèmes d'efflux (Guilhen *et al.*, 2016). Les bactéries dispersées à partir d'un biofilm mature sont également prédisposées génétiquement à adhérer aux surfaces pour reformer un biofilm plus rapidement. De plus, les capacités de colonisation de bactéries issues de biofilms matures sont vraisemblablement facilitées par la modulation du système immunitaire de l'organisme hôte : en modèle murin d'infection intranasale, les bactéries dispersées induisent une réponse immunitaire au niveau pulmonaire diminuée par rapport aux bactéries planctoniques (Guilhen *et al.*, 2019).

Outre les cellules bactériennes, un biofilm est composé d'une matrice extracellulaire faite de polysaccharides, d'ADN et de protéines. Ces matrices confèrent aux biofilms la structure tridimensionnelle, et jouent un rôle dans la formation de canaux impliqués dans les échanges gazeux, de nutriments et d'eau entre les différents individus composant le biofilm (Zhang *et al.*, 1998). La nature et la quantité d'exopolysaccharides produits dans les biofilms varient d'une espèce bactérienne à l'autre mais plusieurs sucres sont retrouvés de façon constante tels que le galactose, le glucose, le mannose, le N-Acetyl-Glucosamine, le rhamnose et le xylose (Bales *et al.*, 2013). Les oses retrouvés majoritairement dans les biofilms à *K. pneumoniae* sont le galactose, le glucose, le mannose et le rhamnose (Bales *et al.*, 2013). L'ADN retrouvé dans les biofilms peut être soit relargué par des bactéries lysées mais peut aussi être sécrété activement (Rabin *et al.*, 2015). Tetz et al., ont montré qu'un traitement à la DNase (5µg/mL) induisait des changements morphologiques et structuraux dans la formation de biofilm par plusieurs bactéries dont *K. pneumoniae*. Ce traitement induit une

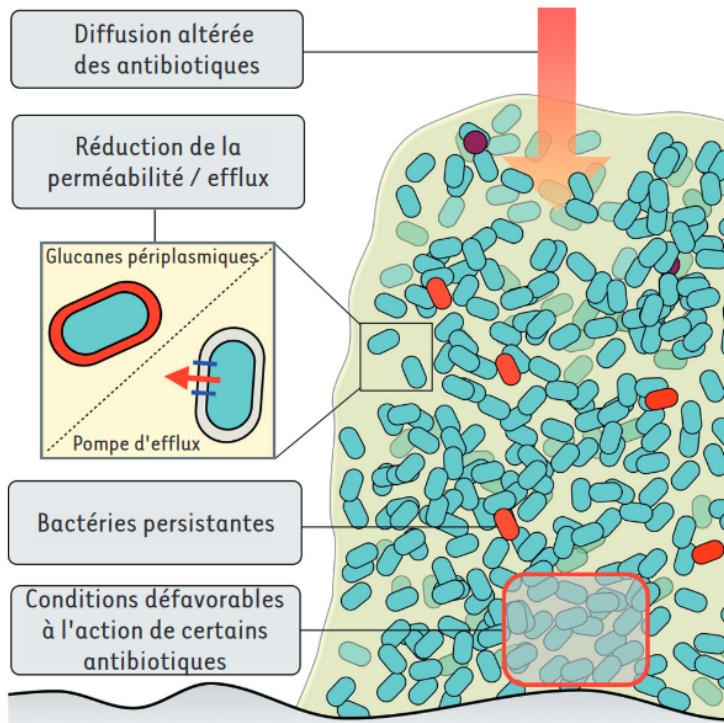


Figure 9. Tolérance et résistance aux molécules antibiotiques au sein d'un biofilm. Des mécanismes de tolérance aux antibiotiques sont mis en place au sein du biofilm et impliquent la matrice d'exopolysaccharides qui inhibe la diffusion de la molécule. La présence de bactéries persistantes (rouge) métaboliquement ralenties sont également tolérantes et ne peuvent pas être ciblées par l'antibiotique. La capsule et de pompes à efflux représentent également des cibles anti-biofilms puisque leur présence confère à *K. pneumoniae* une protection vis-à-vis des molécules anti-microbiennes. Enfin, la concentration en antibiotique étant diminuée du fait de la production de matrice, l'émergence de bactéries acquérant une résistance à l'antibiotique, pouvant transmettre cette résistance par transfert horizontal aux autres individus du biofilm (**D'après Lebeaux and Ghigo, 2012**).

sensibilité accrue aux antibiotiques mais aussi une diminution de la biomasse du biofilm et du nombre de bactéries viables, soulignant le rôle central de l'ADN en tant que constituant de la matrice des biofilms à *K. pneumoniae* (Tetz *et al.*, 2009).

L'institut national de santé américain (US National Health Institute) évalue à 80% le nombre d'infections imputables aux biofilms (Davies, 2003). En effet, le mode vie biofilm représente un avantage pour les bactéries qui le constituent. D'une part, la matrice d'exopolysaccharides confère une tolérance jusqu'à mille fois supérieure aux molécules antibiotiques et aux métaux lourds comparativement au mode de vie planctonique (Flemming *et al.*, 2016; Rasmussen and Givskov, 2006). Ce phénomène est prépondérant dans les couches profondes du biofilm, où des bactéries « persisters » en dormance ne sont pas impactées par l'effet des antibiotiques, mais conservent malgré tout une activité métabolique faible et leur intégrité membranaire (Flemming *et al.*, 2016). D'autre part, le transfert horizontal de gènes est un phénomène favorisé au sein des biofilms, avec notamment des échanges de gènes de résistance aux antibiotiques entre différentes espèces au sein d'un même biofilm, ce qui représente un avantage sélectif notamment d'un point de vue pathogénicité et colonisation de l'hôte (Fux *et al.*, 2005) (**Figure 9**). Cette hypothèse est renforcée par la présence dans certaines souches de *K. pneumoniae* de gènes de résistance aux carbapénèmes associée à une meilleure capacité à former du biofilm (Khodadadian *et al.*, 2018).

Au sein d'un biofilm, les microorganismes régulent l'expression de certains gènes *via* la production de molécules appelées autoinducteurs : c'est le phénomène dit de Quorum Sensing (QS). Le QS consiste en une cascade de signaux de communication aboutissant à la modulation des phénotypes bactériens (Balestrino *et al.*, 2005). Il existe deux principaux systèmes de QS bactériens indépendants : le QS de type I (QS-1) (communication intra-espèce) et le QS de type II (QS-2) (communication inter-espèce). Le QS-1 est médié par des signaux auto-inducteurs 1 (AI-1) : ce sont des acyl homosérine lactone (acyl-HSL). En parallèle, le QS-2 fait suite à la production d'auto-inducteurs 2 (AI-2), médiée par l'enzyme LuxS. Le QS-2 est considéré comme un système de communication universel. La formation de biofilm est retardée dans ses phases précoces pour un mutant $\Delta luxS$ de *K. pneumoniae* comparativement à la souche sauvage. La capacité d'adhésion et d'attachement de ce mutant est également diminuée par rapport à la souche sauvage, suggérant une régulation positive du QS-2 sur la formation de biofilm chez *K. pneumoniae* (Balestrino *et al.*, 2005).

Le développement de modèles *in vivo* est indispensable pour mieux connaître les mécanismes de pathogénicité et le rôle des facteurs de pathogénicité dans le processus infectieux. La compréhension des mécanismes mis en jeu par *K. pneumoniae* pour coloniser un organisme hôte est un domaine d'investigation vaste dans la littérature et le modèle murin reste le plus utilisé pour étudier les infections (pulmonaire, urinaire et bactériémie) : de la colonisation initiale jusqu'aux traitements prophylactiques et thérapeutiques pouvant être adoptés pour contrer ce pathogène. La hiérarchisation et la description de ces différents travaux ont fait l'objet d'une publication, sous la forme d'une revue bibliographique, publiée le 12 juin 2021, dans la revue « Microorganisms » (MDPI) ; elle constitue le chapitre II.1 de ce mémoire.

**II. Un modèle animal pour étudier la physiopathologie des infections à
*K. pneumoniae***

1. Publication n°1

Publication N°1

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

Thomas Merciecca †, Laura Joseph †, 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**



Review

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

Laura Joseph [†], Thomas Merciecca [†], Christiane Forestier, Damien Balestrino ^{*,‡,ID} and Sylvie Miquel [‡]

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

† These authors contributed equally to this work.

‡ 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 *Klebsiella pneumoniae*

Colonization to Dissemination: An Overview of Studies Implementing Murine Models. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1282. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061282>

Academic Editors: Aida 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/>).

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 β-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*, *magA*, 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 β-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 ^a	hvKp ^b	
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]
	Microbiota modification		Microscopy	✓		[41]
		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]
		Lethality	Survival	✓		[51,55]
	Intravenous	Colonization levels	CFU counting	✓	✓	[16,56–58]
		Host status and immune response	Histopathology	✓		[56,58]
			Cytokine quantification	✓		[56–58]
			Microscopy	✓		[59]
		Lethality	Survival	✓	✓	[56,58–60]
	Intraperitoneal	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]
		Microbiota modification	16S Sequencing	✓	✓	[66]
		Lethality	Survival	✓	✓	[16,55,61–66,68–73]
Pulmonary infection	Subcutaneous	Colonization levels	CFU counting	✓	✓	[74,75]
		Host status and immune response	Liver abscess measurement	✓	✓	[74]
		Lethality	Survival	✓	✓	[72,75–77]
	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 ^a	hvKp ^b	
UTI ^c	Intratracheal	Lethality	Inflammatory marker measurement	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	[79,82,84,86,88,92]
			Microscopy		<input checked="" type="checkbox"/>	[92]
		Survival		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	[78,81,85,86,93,95,98]
		Colonization levels Host status and immune response	CFU counting	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	[75,99–118]
			Cytokine quantification	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	[100–103,108,115,116] [99–101,103–120]
		Histopathology	Histopathology	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	[105,110,113,116,119,120]
			Inflammatory marker measurement	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	[100–103,109,114]
			Microscopy		<input checked="" type="checkbox"/>	[105,113]
	Intraurethral	Lethality	Survival	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	[75,77,100,101,111,112,115–120]
		Colonization levels Host status and immune response	CFU counting	<input checked="" type="checkbox"/>		[31,46,121–130]
			Histology	<input checked="" type="checkbox"/>		[127–129]
			Microscopy	<input checked="" type="checkbox"/>		[124,127,128]
CAUTI ^d	Intraurethral	Colonization levels	CFU counting	<input checked="" type="checkbox"/>		[131]

^a cKp: Classical *K. pneumoniae*, ^b hvKp: Hypervirulent *K. pneumoniae*, ^c UTI: Urinary tract infection, ^d 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].

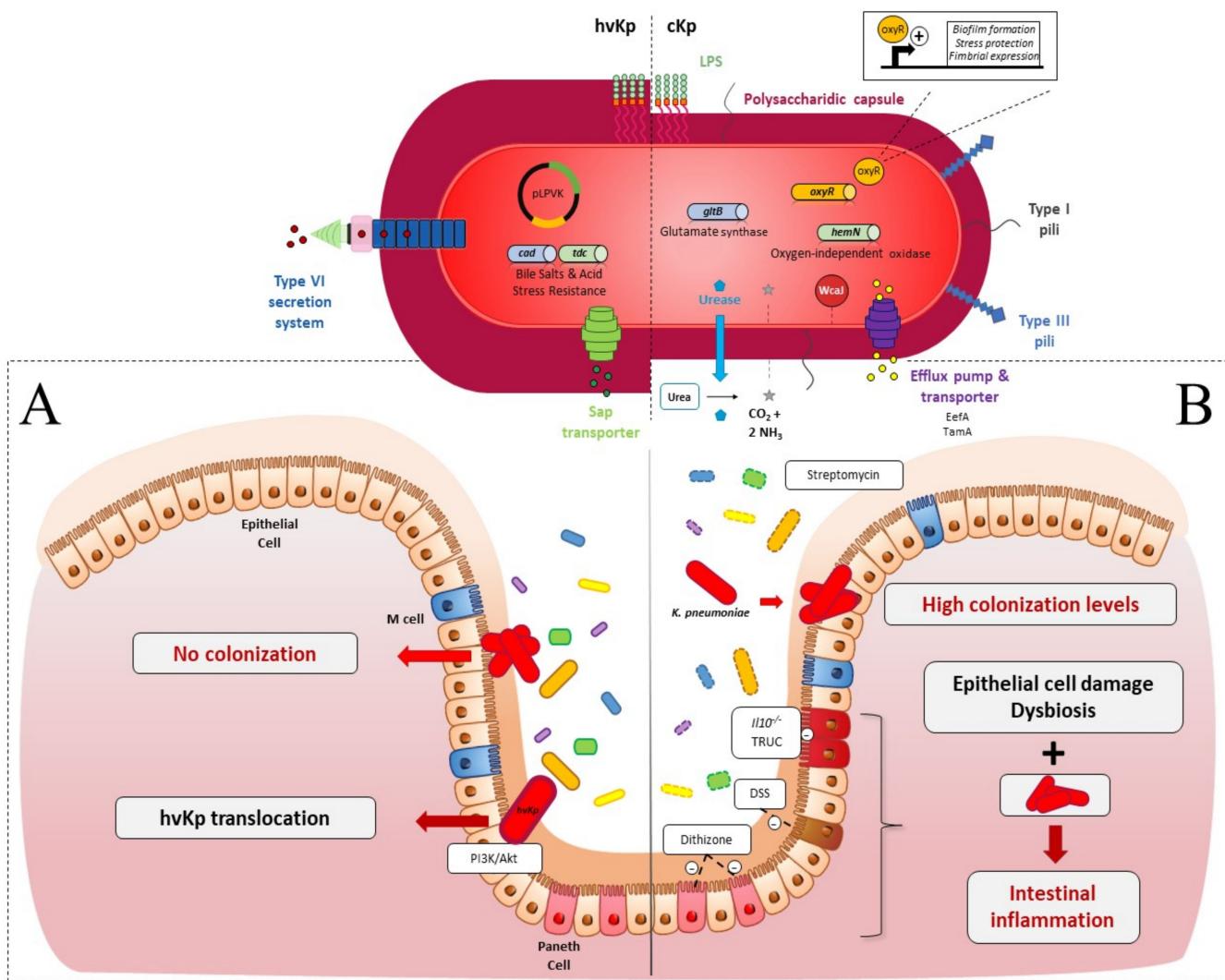


Figure 1. *K. pneumoniae* in the gastrointestinal (GI) tract in an in vivo murine model (A) In healthy immunocompetent mice: (i) cKp (red oval, fine capsule) is not able to colonize the intestinal epithelium due to the presence of upright endogenous microbiota (yellow, blue, green and purple ovals, full 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 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*^{-/-}, *T-bet*^{-/-} *Rag2*^{-/-} 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. Lagraveille 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, Hoyen 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*^{-/-} 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_H1 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*^{-/-} *Rag2*^{-/-} 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 ~10⁸ CFU of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (10² to 10³ 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 $\Delta tamA$ (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 $\Delta fhlA$ (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-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 [32]. 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 [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 Δ 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 $\Delta sapA$ -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]. Intraoperative 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_{KpK1}) is a capsular polysaccharide polymerase specific to serotype K1 [68,71]. $\Delta magA$ mutants lose their mucoviscosity, become susceptible to neutrophil phagocytosis, and are not lethal to mice [68,71]. 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 [53]. After intraperitoneal inoculation in mice, the serine protease *hrtA* mutant in a hvKp strain, abrogated in capsule production, had a 500-fold greater LD₅₀ 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- α 2/3-Man or Rha- α 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- α 2/3-Man or Rha- α 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 unencapsulated Δ 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 Δ 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- α , IL-1 β , 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 Δ 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 galactosyl-transferase 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 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 [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 unencapsulated Δ 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- α level in diabetes mellitus mice, whereas the IL-1 β 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 β -cells, evidenced the ability of cKp and hvKp to translocate into the liver via Kuppffer cell activation. In this model, diabetes mellitus caused enteric dysbiosis, which leads to the production of nitric oxide and the subsequent stimulation of Kuppffer cells [57]. Interestingly, IFN- γ 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- γ 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 μ 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 μ 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 µL, administered sequentially by aliquots of 5 to 10 µL [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- α , IFN- γ 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, $\Delta rcsB$ 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].

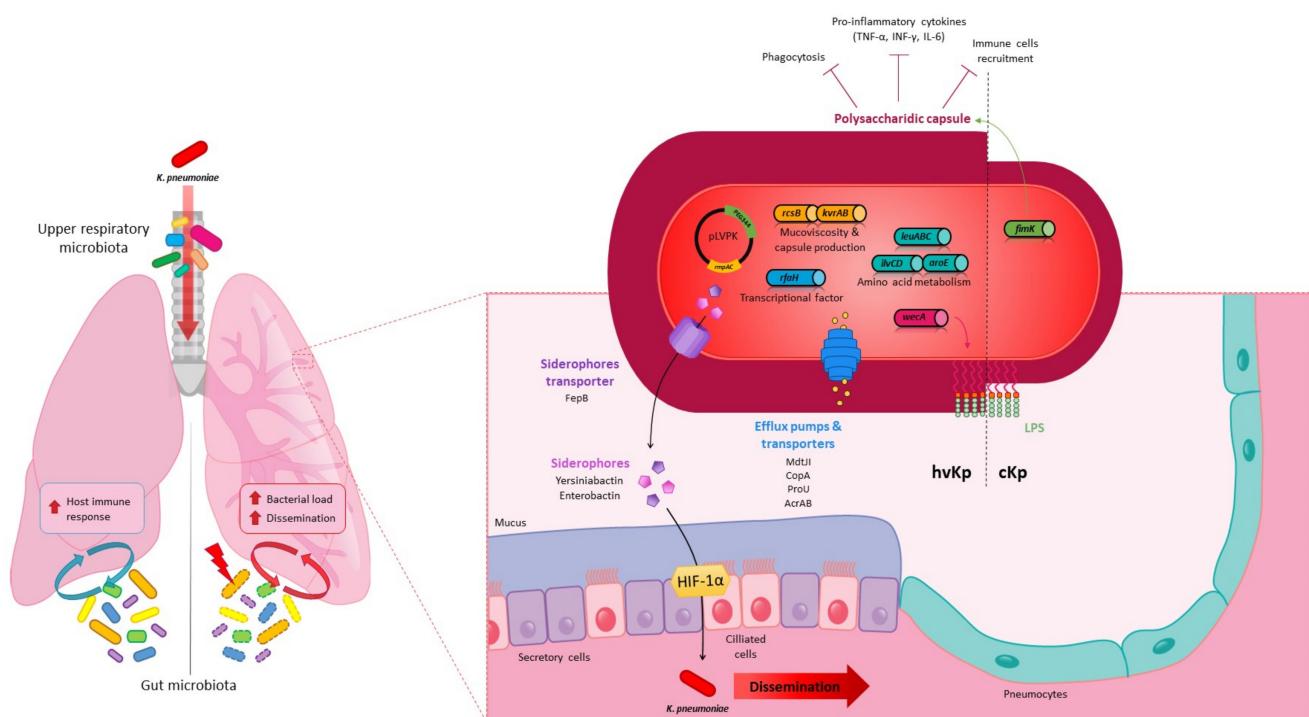


Figure 2. *K. pneumoniae* in the lungs in an in vivo murine model Local (respiratory) and distal (gut) microbiota (yellow, blue, green, and purple ovals) can modulate the host immune response to *K. pneumoniae* (red oval) lung infection and *K. pneumoniae* pathogenicity unlike dysbiotic gut microbiota (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 (MdtJ1, 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 α (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.

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 MdtJI 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 α (HIF-1 α), 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 α 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 α 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- α , 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- α) 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 μ 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 pilus 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 Δmrk 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 Δmrk 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 β -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- α and IL-1 β) 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 AcP-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 (2×10^9 , 2×10^8 , or 2×10^7 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- α 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 (25 µg), 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 Δ 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 (Δpal 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*, *Dictyostelium 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.; Mecsas, 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 β-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.; Socci, 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. JB* **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. Lagraveille, 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. Hoyen, 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 β-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3610–3612. [[CrossRef](#)]
39. Deshpande, A.; Hurless, 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 TH1 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 Pneumonia* 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.; Fürer, 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.; Sepúlveda, 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.; Mecsas, 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 β-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.; Thannickal, 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 α 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.; 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. 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.; Benedí, 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 Pilation 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.I.; 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.; Altarriba, 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.; Bohrnhoff, 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.; Sharma, 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.; Benedí, V.J.; Albertí, S. Role of the HtrA Gene in *Klebsiella pneumoniae* Virulence. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 4772–4776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Athamma, 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 Pneumonia*. *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 *Escherichia 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]

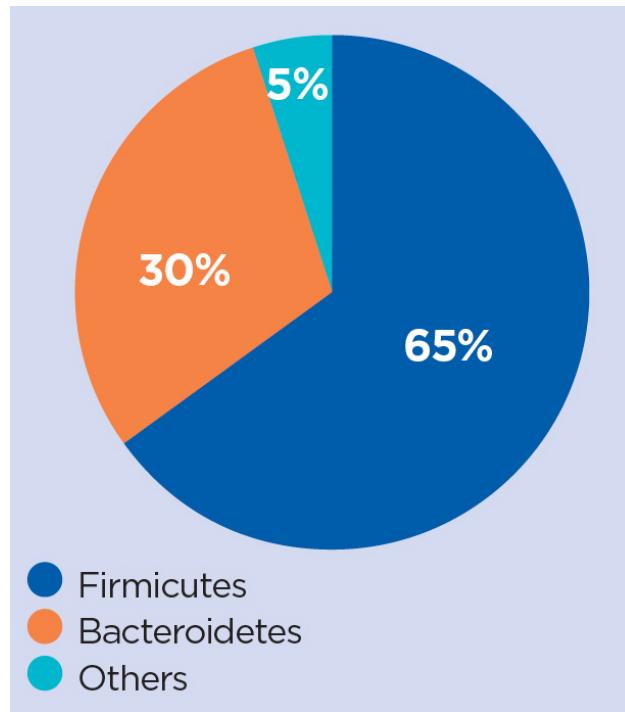


Figure 10. Composition du microbiote intestinal chez un individu sain. Les Firmicutes (*Lactobacillus* et *Streptococcus*) représentent environ 65% de la part relative totale des individus du microbiote, suivies par les Bacteroidetes (30%). Les Protéobactéries et les Actinobactéries sont les phyla majoritaires dans les 5% restants (D'après Knight, 2019).

2. Le microbiote intestinal, un organe à part entière

Chez l'Homme, *Klebsiella spp.* est considérée comme un commensal du microbiote intestinal chez le sujet sain, avec une prévalence de colonisation estimée entre 5 et 35% dans les pays occidentaux (Bagley, 1985; Russo and Marr, 2019). Son caractère pathogène opportuniste est notamment modulé par la présence d'autres individus au sein du microbiote intestinal, capables d'inhiber la colonisation et d'enrayer le processus infectieux (Joseph *et al.*, 2021). La composition du microbiote intestinal de l'organisme hôte et les facteurs susceptibles de perturber cet écosystème local jouent donc un rôle essentiel dans le développement des infections à *K. pneumoniae*.

2.1. Composition du microbiote intestinal

Chez l'Homme, le microbiote intestinal est défini par l'ensemble des microorganismes (procaryotes, eucaryotes et archées) présents dans le tractus gastro intestinal, entre 10^{13} et 10^{14} cellules, soit l'équivalent du nombre de cellules humaines et une masse totale d'environ 0.2 kg (Gill *et al.*, 2006; Sender *et al.*, 2016). La majorité du microbiote intestinal humain est composé de procaryotes, en particulier de bactéries et les phyla majoritaires sont les Firmicutes, les Protéobactéries, les Actinobactéries et les Bacteroidetes (Hugon *et al.*, 2015; Knight, 2019) (**Figure 10**). Les Firmicutes et les Bacteroidetes représentent 90% à 95% de la part relative totale des bactéries du microbiote (Jeffery *et al.*, 2012; Gomaa, 2020). La proportion relative de chacun des phyla varie en fonction des études et d'un ensemble de facteurs intrinsèques à l'hôte et / ou exogènes, mais plus de 1000 espèces différentes ont été identifiées au sein du microbiote intestinal (Gomaa, 2020). L'acquisition du microbiote est un processus débutant lors de la naissance ; il diffère en fonction du mode d'accouchement et de l'allaitement. En effet, le microbiote intestinal d'un enfant né par voie naturelle se constitue en partie avec le microbiote vaginal de la mère, c'est-à-dire riche en Lactobacilles, contrairement à celui d'un enfant né par césarienne qui acquiert un microbiote moins riche et de composition différente, pour lequel le processus d'acquisition est plus long (Thursby and Juge, 2017). Il est admis que la composition et la richesse du microbiote chez l'enfant tendent à être définitivement acquises vers l'âge de 3 à 5 ans, convergeant vers un microbiote « adulte » (Rodríguez *et al.*, 2015).

Dominant gut phyla:

Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia

Predominant families in the:

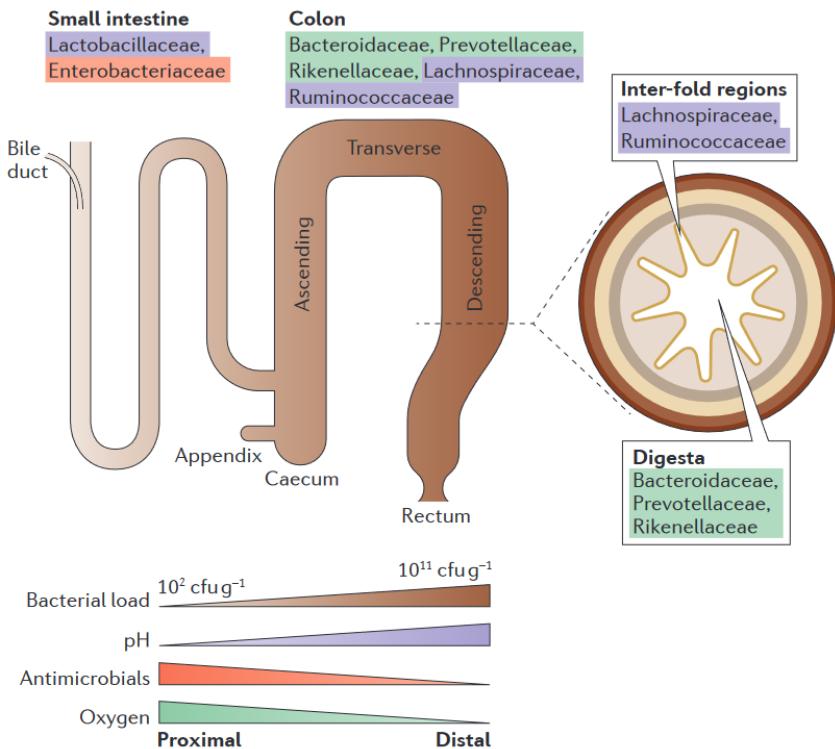


Figure 11. Variations de composition du microbiote intestinal le long du tractus GI. Les phyla majoritaires du microbiote sont représentés par les Bacteroidetes, les Firmicutes et les Actinobactéries. La richesse du microbiote et la répartition des différentes familles composant ces phyla est différente selon la localisation du tractus gastro-intestinal, et est reliée en grande partie aux variations de pH, de molécules antimicrobiennes (sels biliaires) et de disponibilité en oxygène entre l'intestin proximal et distal. En plus de ces variations longitudinales, le microbiote observe également une diversité transversale entre la lumière du colon et les cryptes (**D'après Donaldson et al., 2016**).

La plus grande concentration en bactéries du microbiote est observée dans le colon (10^{11} cellules/mL de contenu), suivi de l'iléon (10^8 cellules/mL de contenu), tandis que de plus faibles concentrations sont retrouvées dans les parties hautes du tractus intestinal (duodénum et jéjunum) (10^3 – 10^4 cellules/mL de contenu) (Sender *et al.*, 2016). La composition du microbiote varie également le long du tractus digestif de façon longitudinale (des parties hautes vers les parties basses) mais également transversale (lumière intestinale et mucus). Ces variations sont liées aux différents gradients de molécules antimicrobiennes (les sels biliaires notamment) et des paramètres physico-chimiques (pH, oxygène) (Donaldson *et al.*, 2016). Si dans les parties hautes du tractus, la présence de sels biliaires et un pH acide favorisent la présence des *Lactobacillaceae* et *Enterobacteriaceae*, les conditions anaérobies retrouvées dans le colon, associées à un temps de transit long et au manque de nutriments facilement assimilables, sont associées à la présence de microorganismes anaérobies capables de dégrader les polysaccharides par voie fermentative, comme les *Bacteroidaceae* et les *Clostridia* (Donaldson *et al.*, 2016) (**Figure 11**). Enfin de la même façon, les Bacteroidetes sont prépondérants dans la lumière intestinale, tandis que les Firmicutes sont majoritaires dans les villosités du colon, associées au mucus (Donaldson *et al.*, 2016). Cette répartition pourrait être liée à une disponibilité et une utilisation différente des nutriments dans les couches de mucus et dans la lumière intestinale (Li *et al.*, 2015). De plus, les bactéries associées à la muqueuse interagissent fortement avec l'hôte, influençant le système immunitaire et contribuant à son homéostasie et celle du microbiote intestinal (Dieterich *et al.*, 2018). Enfin, le microbiote fécal - souvent utilisé comme matériel d'étude en raison de la facilité de prélèvement - est clairement distinct du microbiote associé à la muqueuse du colon chez l'Homme (Zoetendal *et al.*, 2002).

Le modèle murin est très fréquemment utilisé dans les études du microbiote intestinal ; comme chez l'Homme, la composition de ce microbiote diffère aux niveaux colique et fécal (Mu *et al.*, 2022). Le microbiote fécal est majoritairement utilisé pour évaluer la diversité microbienne intestinale (β diversité) et la richesse (α diversité), notamment du fait de sa facilité d'accès. La diversité du microbiote est donc certainement biaisée et sous-estimée lors de méta-analyses à partir d'amplification d'ARNr 16S extraits d'échantillons de selles. D'autres techniques d'analyses métagénomiques complémentaires permettent également d'évaluer la composition du microbiote intestinal, de la PCR quantitative au séquençage « shotgun ». Cette

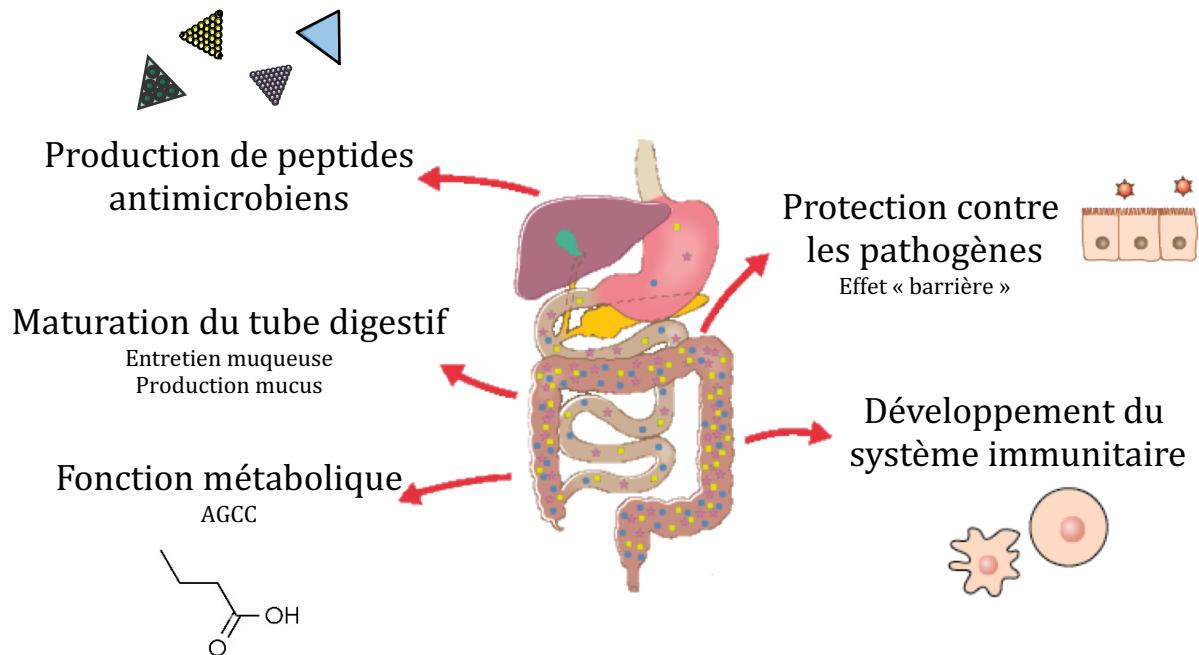


Figure 12. Rôles du microbiote intestinal. Les commensaux protègent de la colonisation des pathogènes par des mécanismes de compétitions directes (nutriments, molécules antibactérienne, modulation de la virulence ou des paramètres de l'environnement) ou indirects, en renforçant le rôle barrière de l'hôte (sécrétion de mucus, production de cytokines, d'anticorps et de peptides antimicrobiens) (Adapté de « Rôles du microbiotes et pathologies » ; Source : www.annabac.com).

dernière technique, basée sur le séquençage de génomes complets, présente une très bonne spécificité et sensibilité en termes de discrimination d'espèces et permet donc de mettre en évidence de nouvelles espèces bactériennes (Aron-Wisnewsky *et al.*, 2020; Ranjan *et al.*, 2016; Thomas *et al.*, 2015). De plus, les approches multi-omiques récemment développées, telles la métabolomique, la transcriptomique ou encore la volatolomique, permettent la caractérisation fonctionnelle d'un microbiote, en appréciant à la fois sa composition et ses spécificités ou signatures (Aron-Wisnewsky *et al.*, 2020; Dausset *et al.*, 2020).

2.2. Rôles du microbiote intestinal

2.2.1. Résistance à la colonisation par des pathogènes

Différents rôles essentiels sont assurés par le microbiote intestinal (**Figure 12**) dont le principal étant celui de barrière physique et chimique contre les pathogènes, permettant la résistance à la colonisation. Cet effet peut être direct, comme dans le cas de la compétition entre pathogènes et commensaux, en lien notamment avec une course aux nutriments. En effet, les *E. coli* commensaux peuvent entrer en compétition avec les homologues pathogènes, *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) vis-à-vis des sources d'acides organiques et ainsi favoriser leur élimination (Momose *et al.*, 2008). La pré-inoculation intestinale chez une souris par une souche d'*E. coli* humaine commensale protège également de l'infection par un EHEC O157 :H7 et cette action pourrait dépendre de l'accès aux nutriments (Leatham *et al.*, 2009). Les bactéries commensales peuvent aussi coopérer entre elles pour limiter l'accès aux nutriments pour les pathogènes et ainsi inhiber leur capacité de colonisation. Ainsi, la présence de *K. oxytoca* au sein du microbiote intestinal en modèle murin améliore la résistance à la colonisation par des bactéries pathogènes appartenant au même genre mais à une espèce différente, *K. pneumoniae* (Osbelt *et al.*, 2021). Les bactéries du microbiote peuvent également sécréter des molécules antibactériennes qui agissent directement sur les pathogènes ; c'est le cas des bactériocines, sécrétées par *E. coli* et capables d'inhiber la croissance des EHEC (Schamberger and Diez-Gonzalez, 2002). *Bifidobacterium* spp. est également capable de modifier les paramètres physico-chimiques de son milieu et, en acidifiant le pH de son environnement *via* la production d'acétate, limitant la colonisation par les *E. coli* pathogènes (Fukuda *et al.*, 2011).

Le microbiote intestinal renforce aussi la barrière épithéliale en modulant ses propriétés et celles du mucus qui la recouvre. La barrière intestinale est constituée de plusieurs types cellulaires spécialisés, chacun ayant des fonctions spécifiques (entérocytes, cellules de Paneth, cellules caliciformes). La modulation de la perméabilité de cette barrière intestinale est notamment permise grâce à plusieurs protéines de jonctions serrées transmembranaires, (occludines, claudines, zonula occludens (ZOs)), qui interagissent les unes avec les autres pour former un complexe imperméable (Chelakkot *et al.*, 2018). Le rôle du microbiote intestinal est prépondérant dans la régulation et la modulation des jonctions serrées. Il a ainsi été montré *in vitro* que le traitement de cellules intestinales Caco-2 par des probiotiques *L. plantarum* DSM 2648 ou encore *E. coli* Nissle 1917 stimule l'expression des gènes codant les protéines de jonctions serrées (Anderson *et al.*, 2010; Putala *et al.*, 2008). De même, la présence de *Bifidobacterium spp.* est associée à une fonction barrière améliorée, grâce à une augmentation de l'expression des gènes codant les protéines de jonctions serrées (Sharma *et al.*, 2010). De plus, la production de peptides antimicrobiens (cathélicidines, lysozymes, angiogenine 4, phospholipase, protéines de liaison au lipopolysaccharides (LPS), lectines) par les cellules de Paneth est activée par le microbiote (Vaishnava *et al.*, 2008). Cet effet a notamment été montré dans des essais impliquant des souris Germ Free (GF ou axéniques) incapables de produire ces peptides et pour lesquelles la colonisation par des pathogènes est augmentée (McGuckin *et al.*, 2011; Vaishnava *et al.*, 2008).

Le mucus est composé essentiellement de glycoprotéines ou mucines, notamment MUC2, au niveau du petit intestin et du colon. Ces molécules représentent une source de carbones pour les commensaux qui l'auto-entretiennent (Juge, 2012). Par exemple, *Bacteroides thetaiotaomicron* est capable de cliver le fucose des glycanes du mucus, activant ainsi sa sécrétion par les cellules caliciformes, ce qui suggère un auto-entretien du mucus par le microbiote de l'hôte. *B. thetaiotaomicron* utilise quant à lui ce fucose pour synthétiser une capsule polysaccharidique lui conférant un avantage compétitif (Martens *et al.*, 2009).

2.2.2. Fonction immunomodulatrice

Le système immunitaire n'échappe pas à une régulation fine médiée par les microorganismes présents dans le microbiote intestinal, qu'ils soient commensaux ou pathogènes. La reconnaissance des bactéries est liée à la présence d'un ensemble de cellules

immunitaires lymphoïdes au niveau intestinal. Les modèles de souris GF ont permis de montrer que la production des IgAs est stimulée par le microbiote et ses métabolites, comme les acides gras à chaînes courtes (AGCC) (Takeuchi and Ohno, 2021). Ces IgAs, présents dans le mucus, constituent un élément de protection vis-à-vis des pathogènes, en plus de renforcer la fonction barrière de l'épithélium (Lin and Zhang, 2017; Thursby and Juge, 2017). De plus, l'activation de l'immunité innée par la liaison des Patterns Recognition Receptors (PRRs) aux motifs bactériens entraîne une cascade d'événements intracellulaires menant à l'activation de différentes voies pro-inflammatoires (NF-κB, MAPKineses et caspases) et à la production de cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- α (Magrone and Jirillo, 2013). Ces récepteurs PRRs, Toll-like et Nod-like, reconnaissent des motifs bactériens particuliers comme le LPS pour le TLR4, ou encore les composants de la membrane des bactéries à Gram positif par les TLR2 (Dieterich *et al.*, 2018). De même, le microbiote intestinal permet le conditionnement des macrophages résidents pour la conversion de la pro-IL-1 β immature en IL-1 β mature, permettant une activation rapide du système immunitaire lors d'infection (Franchi *et al.*, 2012). La tolérance du microbiote intestinal par les cellules de l'immunité reste mal comprise mais le rôle de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 semble essentiel. En effet, les souris KO IL-10 $^{-/-}$, déficiente pour la production d'IL-10, sont souvent utilisées en tant que modèle pour des développements de colites associées à une dysbiose marquée (augmentation des Protéobactéries notamment) (Kidess *et al.*, 2021; Levast *et al.*, 2015; Maharshak *et al.*, 2013). Enfin, le microbiote participe à l'activation des T-helper17 stimulant la sécrétion de cytokines IL-22, menant à la production de peptides antimicrobiens comme RegIIIy par l'épithélium intestinal, protégeant de l'infection en modèle murin (Kamada *et al.*, 2013). Au sein du microbiote, l'homéostasie de l'épithélium ainsi que celle de l'immunité de l'hôte sont modulées par une balance entre phénomènes inflammatoires et tolérance en lien avec les commensaux et la présence potentielle de pathogènes.

2.2.3. Fonction métabolique

Les rôles métaboliques du microbiote intestinal sont fonctionnels et trophiques. L'intestin humain ne possède pas la capacité de digérer les polysaccharides complexes (fibres notamment) et ceux-ci se retrouvent fermentés par le microbiote au niveau colique (Yadav *et al.*, 2018). La première étape est la transformation des fibres en oses simples, *via* des

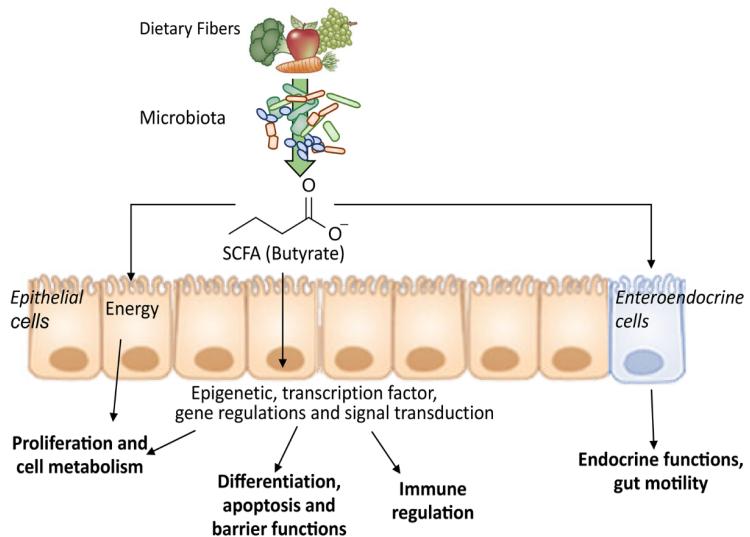


Figure 13. Production de butyrate par le microbiote intestinal et rôles bénéfiques associés. Le butyrate est le principal AGCC produit par le microbiote, est la source principale d'énergie des cellules épithéliales intestinales et est impliqué dans un ensemble de fonctions essentielles à la barrière intestinale. La stimulation de la sécrétion hormonale intestinale est également médieée par les récepteurs du butyrate porté par les cellules endocrines (D'après Martin Gallausiaux et al., 2021).

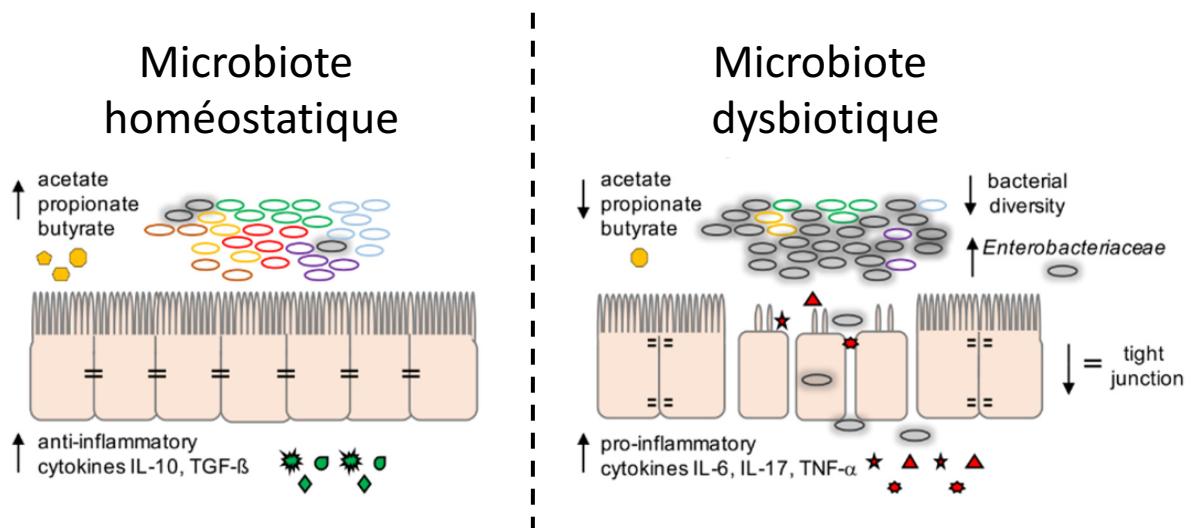


Figure 14. Passage de l'état homéostatique à l'état dysbiotique du microbiote intestinal. Le microbiote sain joue un rôle essentiel dans l'homéostasie intestinale, notamment par la production d'AGCC, l'effet barrière contre les pathogènes, le maintien des structures épithéliales et la modulation du système immunitaire via la production de cytokines anti-inflammatoires. Dans le cas d'un état dysbiotique après perturbation, la diversité microbienne est impactée, inhibant la production d'AGCC ainsi que la capacité à réguler les jonctions serrées des cellules épithéliales. La présence d'entérobactéries est alors favorisée, contribuant à l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires exacerbant le terrain de colite (D'après Baldelli et al., 2021).

bactéries saccharolytiques, ensuite eux-mêmes dégradés en métabolites secondaires (H_2 , CO_2 , méthane et AGCC) (Marteau, 2013).

Les AGCC (butyrate, propionate et acétate) sont impliqués dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire (Tan *et al.*, 2014) (**Figure 13**). Ils sont également essentiels pour le maintien de l'intégrité structurale de la barrière épithéliale en réduisant sa perméabilité *via* une action sur les jonctions serrées et la modulation des couches de mucus. En effet, *B. thetaiotaomicron* est notamment capable de produire de l'acétate, capable d'induire la différenciation des cellules caliciformes, augmentant ainsi leur nombre et favorisant la production de mucus (Wrzosek *et al.*, 2013). Le butyrate joue un rôle essentiel en tant que nutriment et source d'énergie principale pour les colonocytes. Il agit également sur le système immunitaire en induisant la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T régulateurs, mais il exerce aussi un effet anti-inflammatoire, en diminuant notamment la production des médiateurs de l'inflammation (Martin-Gallausiaux *et al.*, 2021).

Les commensaux ont également un rôle central dans la transformation des acides biliaires primaires conjugués (acide chénodésoxycholique et cholique) en acides biliaires secondaires déconjugués (acide lithocholique et désoxycholique) (Yadav *et al.*, 2018). Plusieurs familles bactériennes synthétisent une hydrolase (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*) permettant cette déconjugaison et ainsi la réabsorption de ces acides biliaires par le foie. Enfin, la synthèse de vitamines (B et K principalement) est également assurée par le microbiote intestinal (*Bacteroidetes*) (Magnúsdóttir *et al.*, 2015; Said, 2013).

2.3. Facteurs influençant la composition du microbiote

La perturbation du microbiote par différents facteurs conduit progressivement au passage du microbiote de l'état homéostatique à l'état dysbiotique. La dysbiose se définit comme une perturbation du microbiote sous l'effet de facteurs génétiques ou environnementaux, entraînant soit la prolifération de bactéries délétères pour l'hôte (*Enterobacteriaceae*) soit la diminution de bactéries bénéfiques (Firmicutes et Bacteroidetes) (**Figure 14**) (Stewardson *et al.*, 2015; Jernberg *et al.*, 2007). L'état de dysbiose est notamment incriminé dans l'apparition de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), tels que le syndrome de l'intestin irritable, la maladie de Crohn ou encore la colite ulcéreuse, mais

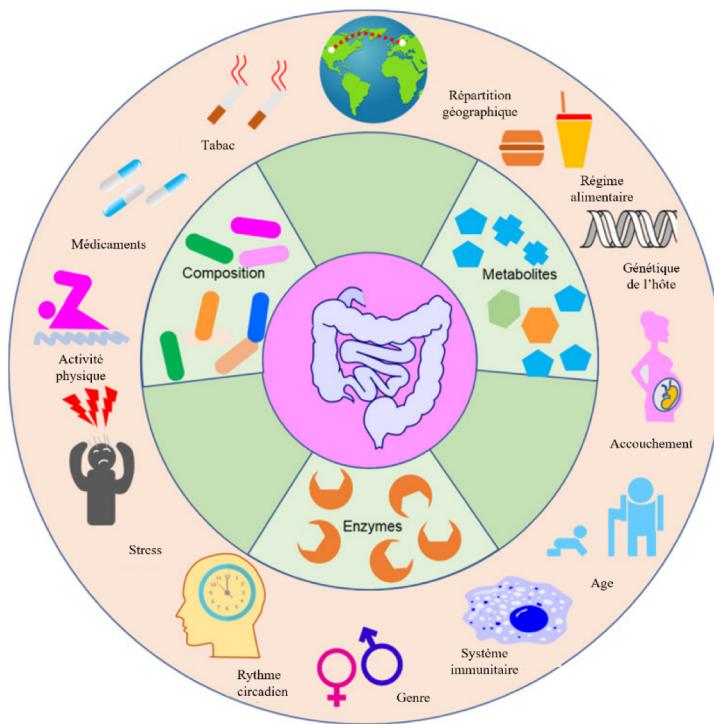


Figure 15. Facteurs influençant la composition et les fonctions du microbiote intestinal. Le microbiote intestinal peut être modulé par un ensemble de facteurs intrinsèques à l'hôte (stress, système immunitaire, patrimoine génétique) ou environnementaux (régime alimentaire, tabagisme, consommation de médicaments). L'ensemble de ces facteurs influencent la composition du microbiote, mais aussi son activité enzymatique et les métabolites issus de celui-ci (Adapté de Feng *et al.*, 2020).

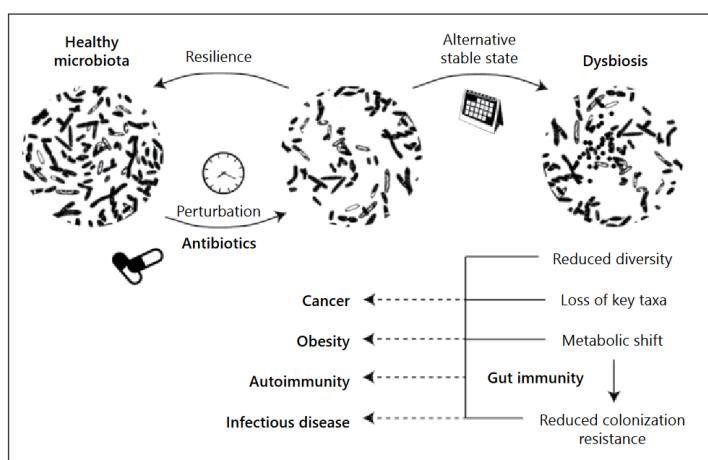


Figure 16. Concept de résilience du microbiote intestinal. L'administration d'antibiotiques chez le sujet sain entraîne une baisse de diversité et de richesse du microbiote, caractérisée par la perte de taxons importants. La dysbiose alors observée peut être soit transitoire, permettant un retour à un état d'équilibre, le phénomène de résilience, ou bien celui-ci peut être perturbé de façon plus importante et ainsi engendrer des désordres métaboliques importants, impactant un ensemble de fonctions essentielles dont la résistance à la colonisation par les pathogènes, et engendrer des pathologies liées au microbiote altéré (cancer, obésité, désordres autoimmuns et infections) (D'après Lange *et al.*, 2016).

aussi dans d'autres pathologies telles que le diabète de type I, l'arthrite rhumatoïde et des scléroses multiples (Dieterich *et al.*, 2018; Martinez *et al.*, 2021). Le maintien d'un équilibre au sein de cet écosystème est lié à de nombreux facteurs capables de moduler la composition et la richesse du microbiote intestinal : l'âge, la génétique, le régime alimentaire, la sédentarité ou au contraire l'activité physique, la consommation d'alcool et de tabac et la zone géographique (Gomaa, 2020) (**Figure 15**), mais la prise d'antibiotiques est le principal facteur favorisant la dysbiose.

Une dysbiose impacte la diversité bactérienne mais entraîne également une diminution du potentiel métabolique et une inhibition de la capacité de résistance à la colonisation par des pathogènes (Lange *et al.*, 2016). Cet état dysbiotique est d'autant plus préoccupant qu'il peut s'accompagner d'une augmentation de l'abondance de gènes de résistance et ce même vis-à-vis d'antibiotiques non administrés (Looft *et al.*, 2014; Looft and Allen, 2012; Looft *et al.*, 2012). Le microbiote peut revenir à un état d'équilibre lorsque le stress ayant entraîné sa perturbation est levé, à la fois en termes de composition et de richesse, mais cet état d'équilibre retrouvé - un phénomène appelé résilience - peut être différent de l'état initial (**Figure 16**). Pour un même traitement antibiotique, chaque individu aurait un état de résilience qui lui est propre, dans un laps de temps spécifique (Lozupone *et al.*, 2012). Par exemple, l'administration de ciprofloxacine conduit à une dysbiose intestinale chez le patient dès 3 jours après traitement (2x500mg/jour) avec un retour à un état d'équilibre bien qu'incomplet 1 semaine après la fin du traitement (Dethlefsen and Relman, 2011). La dysbiose s'installe donc rapidement lors d'un traitement antibiotique et certaines études montrent qu'un traitement, même court, induit une dysbiose qui peut perdurer jusqu'à 2 ans post-traitement ; de même, la persistance des gènes de résistance dans les membres de l'écosystème a été observée jusqu'à 4 ans après la fin du traitement (Jernberg *et al.*, 2007; Jakobsson *et al.*, 2010).

La prise d'antibiotiques est bien sûr bénéfique pour lutter contre les pathogènes responsables de l'infection, mais agit également sur les commensaux des microbiotes en affectant particulièrement la capacité de ceux-ci à protéger de la colonisation par certains pathogènes comme *Clostridoides difficile* (Johnson and Gerding, 1998; Schubert *et al.*, 2015), les entérocoques vancomycine résistants (VRE) (Donskey *et al.*, 2000; Ubeda *et al.*, 2010; Arias and Murray, 2012) et les *Enterobacteriaceae* (Olsan *et al.*, 2017). Ainsi, l'administration orale

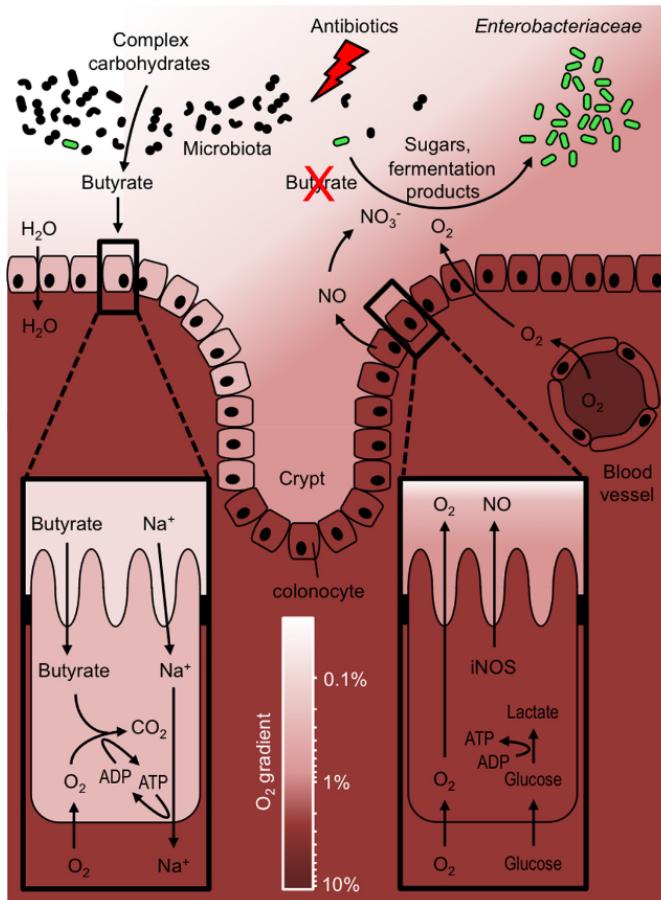


Figure 17. Perturbation du métabolisme du butyrate par les colonocytes et expansion des *Enterobacteriaceae*. L'administration d'antibiotiques (streptomycine) induit la suppression d'espèces productrices de butyrate (Clostridia, Bacteroidia) au niveau intestinal. Le butyrate est la principale source d'énergie des colonocytes qui métabolisent celui-ci par voie fermentative (production d'ATP pour permettre l'utilisation du sodium Na^+). Les conditions hypoxique dans la lumière du colon sont alors maintenues. En l'absence de butyrate, un switch métabolique s'opère dans les cellules épithéliales qui vont consommer du glucose pour produire de l'ATP, et ainsi faire augmenter les niveaux d' O_2 et de nitrates (NO_3^-) dans le colon, favorisant l'expansion des pathogènes opportunistes dont les *Enterobacteriaceae* (D'après Olsan *et al.*, 2017).

de streptomycine dans un modèle murin entraîne une diminution significative de bactéries bénéfiques, productrices de butyrate dans le caecum et le colon, et favorise l'expansion des pathogènes opportunistes (*S. enterica*, *E. coli*) (Olsan *et al.*, 2017) (**Figure 17**). De même, un traitement de 5 jours avec une association amoxicilline - acide clavulanique chez des patients entraîne une hausse des *E. coli* et entérocoques résistants à l'amoxicilline au sein de leur écosystème digestif ainsi qu'une inhibition à long terme des *Bifidobacteriaceae*, essentiels dans la production d'AGCC (Mangin *et al.*, 2012; Bertrand *et al.*, 2007). En clinique humaine, *Escherichia* et *Klebsiella* sont les deux genres bactériens les plus représentés chez des patients en état de choc septique ayant reçu un traitement antibiotique en comparaison à des sujets sains (Ubeda *et al.*, 2010; Mu *et al.*, 2022).

3. *K. pneumoniae* : de la colonisation à l'infection

La colonisation de l'intestin par *K. pneumoniae* est le facteur de risque principal de survenue d'une infection à distance, dont l'origine provient, dans 50 % des cas, de la même souche isolée au niveau intestinal (Gorrie *et al.*, 2017; Kontopoulou *et al.*, 2019). Martin *et al.* ont montré que 54 % des patients (n=39) ayant développé une infection à *K. pneumoniae* étaient porteurs asymptomatiques au niveau intestinal contre 46% de non-porteurs (Martin *et al.*, 2016). Les phénomènes à l'origine de cette dissémination restent encore peu décrits et controversés, mais deux hypothèses peuvent être envisagées. La première est le franchissement de la barrière épithéliale intestinale par la bactérie, c'est le phénomène de translocation. Une seule étude *in vitro* vient soutenir cette hypothèse, dans laquelle il a été montré qu'une souche de *K. pneumoniae* hypervirulente est capable de réarranger le cytosquelette d'actine des cellules épithéliales (*via* la voie Pi3k/AKT (Phosphoinositol-3-kinase Akt)) pour permettre son passage dans la circulation sanguine depuis l'intestin et provoquer des infections disséminées (Hsu *et al.*, 2015). Mais cette translocation peut-être plus passive et liée à une altération de l'épithélium intestinal. En effet, une simple administration d'antibiotiques suffit à augmenter la perméabilité paracellulaire de l'épithélium intestinal, ce qui facilite le franchissement de la barrière intestinale par *K. pneumoniae* et sa dissémination (Mu *et al.*, 2022). La deuxième hypothèse, plus probable, est que la bactérie pourrait, après colonisation des voies digestives supérieures, disséminer *via* des phénomènes de reflux gastro-oesophagiens. En effet, les patients immunodéprimés médicalisés sont souvent traités par des médicaments anti-acides favorisant la survie et la

prolifération des pathogènes entériques au niveau de l'estomac, comme c'est le cas pour *K. pneumoniae* (Reveles *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2012). De plus, la présence de sondes nasogastriques chez ces patients est associée aux infections à *K. pneumoniae* (Pan *et al.*, 2019). Ces dispositifs médicaux pourraient ainsi faciliter la dissémination bactérienne du tractus digestif vers la sphère respiratoire.

3.1. Facteurs de pathogénicité impliqués spécifiquement dans la colonisation

Les facteurs de pathogénicité mis en œuvre par *K. pneumoniae* pour coloniser l'intestin de son organisme hôte sont relativement bien décrits dans la littérature et ont été discutés dans l'article 1. Ceux-ci impliquent à la fois des enzymes et des régulateurs transcriptionnels produits par la bactérie (*gltB*, *hemN*, *oxyR*), mais aussi des molécules conférant un avantage métabolique, comme les sidérophores ou encore l'uréase. Chou *et al.* ont également mis en évidence la présence d'îlots chromosomiques apparentés au **métabolisme de l'allantoïne**, dans des souches de *K. pneumoniae* isolées d'abcès du foie (Chou *et al.*, 2004). L'allantoïne, une purine riche en azote, peut être utilisée par la bactérie comme seule source d'azote en conditions aérobie ce qui représente un avantage compétitif (Guzmán *et al.*, 2011). Ainsi, la délétion du gène *allS* chez une souche hypervirulente, un activateur transcriptionnel de l'opéron impliqué dans le métabolisme de l'allantoïne, induit une mortalité moins sévère (diminution de la DL₅₀) chez des souris inoculées par voie intragastrique, en comparaison avec les données obtenues en administrant la souche sauvage (Chou *et al.*, 2004). De même, Xue *et al.* ont montré que le régulateur CRP (cyclic-AMP receptor protein) module positivement l'expression du gène *allS* (Xue *et al.*, 2016). Ainsi, l'infection de souris par des mutants de *K. pneumoniae* inhibés dans la production de CRP induit une mortalité moins marquée en comparaison aux souris infectées par la souche NTUH-K2044 sauvage. À la vue de la plus forte prévalence du gène *allS* dans les souches de *K. pneumoniae* responsables d'abcès du foie, ce facteur de pathogénicité serait plus susceptible d'être retrouvé chez les souches de sérotype capsulaire K1 et jouerait un rôle dans la dissémination extra-intestinale de *K. pneumoniae* lors du processus infectieux (Yu *et al.*, 2008; Brisse *et al.*, 2009; Russo and Marr, 2019). L'**opéron ter**, retrouvé dans plusieurs isolats cliniques de *K. pneumoniae* responsables d'infections, confère une résistance au tellurite (Martin *et al.*, 2018; Passet and Brisse, 2015). La présence de cet opéron améliore le fitness de *K. pneumoniae* au niveau intestinal en lien avec la

présence de bactéries productrices d'AGCC au sein du microbiote (Vornhagen *et al.*, 2021). Cependant, la délétion des gènes de l'opéron *ter* chez *K. pneumoniae* n'a pas d'impact sur la capacité d'infection de la bactérie dans un modèle pulmonaire murin ni dans un modèle de bactériémie (Martin *et al.*, 2018; Vornhagen *et al.*, 2021).

A ces facteurs, liés notamment à des améliorations voire à des adaptations du métabolisme bactérien, s'ajoute la prédisposition de l'hôte à l'infection par *K. pneumoniae*. Afin de mimer ces phénomènes, des modèles murins modifiés chimiquement ou génétiquement ont été développés.

3.2. *K. pneumoniae* et microbiote intestinal : un point d'équilibre

En modèle murin, le pré-traitement antibiotique est considéré comme un standard pour l'étude de la colonisation intestinale par des pathogènes. Miller et Bonhoff ont démontré pour la première fois en 1963 que des souris traitées oralement avec de la streptomycine étaient beaucoup plus susceptibles à l'infection par *Salmonella*, du fait de la disparition des *Bacteroides* du microbiote intestinal murin (Miller and Bohnhoff, 1963). Il en est de même pour l'implantation de *K. pneumoniae*, soulignant le rôle primordial de la barrière du microbiote dans la résistance à la colonisation (Miller and Bohnhoff, 1963; Maroncle *et al.*, 2006; Khater *et al.*, 2015; Coudeyras *et al.*, 2008). Le rôle majeur du microbiote en tant que protecteur de la colonisation par *K. pneumoniae* a été discuté dans la partie 2.1 de l'article 1 qui regroupe l'essentiel des résultats associés aux perturbations du microbiote en lien avec la colonisation par *K. pneumoniae* dans sa niche écologique (Joseph *et al.*, 2021). Des études très récentes viennent compléter la compréhension du rôle du microbiote intestinal dans la physiopathologie des infections à *K. pneumoniae*.

3.2.1. Les modèles animaux de colonisation intestinale par *K. pneumoniae*

Mu *et al.* ont démontré que *K. pneumoniae* devenait l'espèce dominante dans le microbiote de patients septiques admis en soins intensifs et traités avec des antibiotiques à large spectre, une semaine après hospitalisation. Les souches isolées du microbiote patients étaient directement responsables de bactériémies et d'infections abdominales (Mu *et al.*, 2022). Ces données cliniques peuvent être reproduites en modèle murin ; ainsi la colonisation intestinale par des souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes augmente après

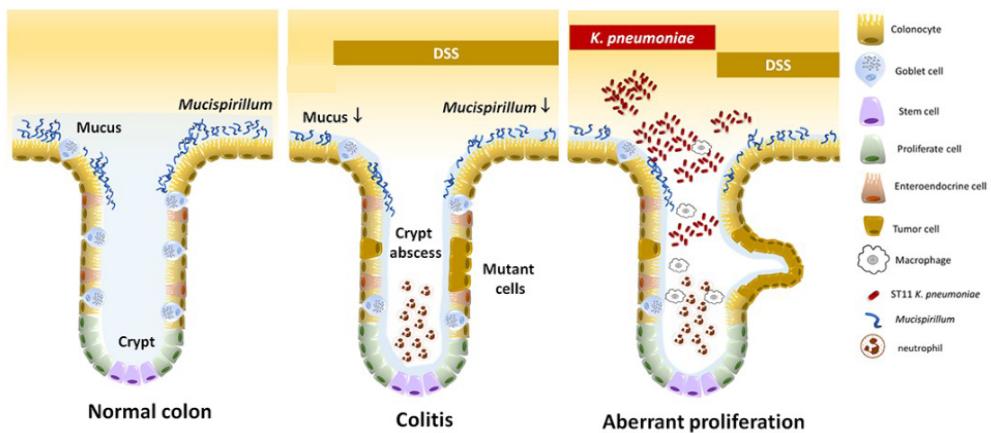


Figure 18. Description du modèle murin de colite ulcéreuse avec traitement au Dextran Sodium Sulfate (DSS). L'administration de DSS aux souris en oral induit une inhibition de la production de mucus et l'abondance des bactéries bénéfiques associées à ce mucus (*Mucispirillum*), conduisant à la formation d'abcès dans les cryptes et une accumulation de neutrophiles dans ces dernières. Sur ce terrain pro-inflammatoire, *K. pneumoniae* agrave l'inflammation via un recrutement excessif de macrophages, produisant de façon massive de l'IL-10. Cette production incontrôlée d'IL-10 entraîne une prolifération aberrante de cellules tumorales, initiant la carcinogénèse (Adapté de Chiang et al., 2021).

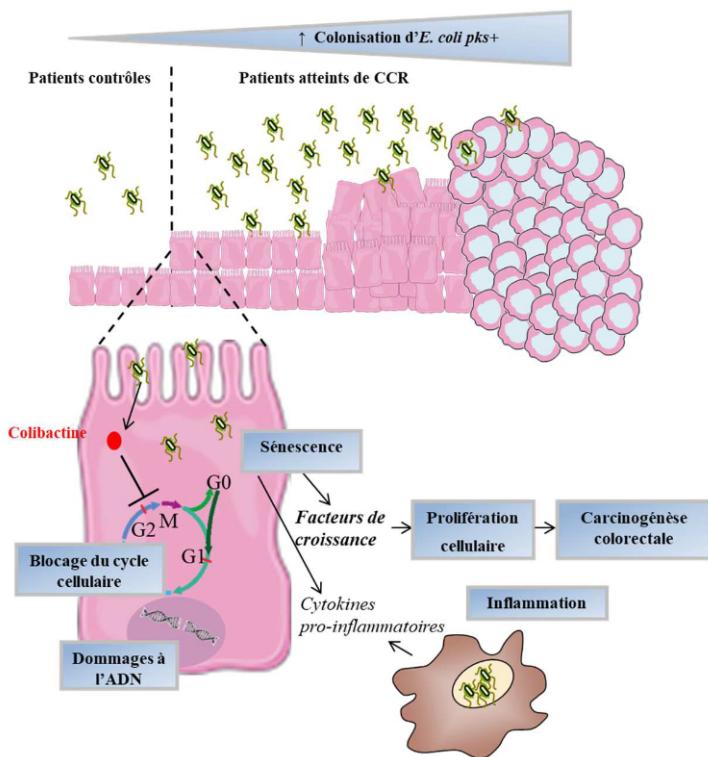


Figure 19. Principe d'action de la colibactine chez les *E. coli pks* positifs. Chez des patients porteurs d'*E. coli pks+* au niveau intestinal, la production de cette colibactine par les souches productrices dans les cellules épithéliales entraîne l'arrêt de la division cellulaire en phase G2 et une sénescence des cellules infectées, conduisant à terme à une inflammation via la réplication en macrophages. Également, la sénescence des cellules épithéliales intestinales inhibe la régulation des facteurs de croissance menant à la prolifération incontrôlée des cellules et une carcinogénèse colorectale (D'après Cecily Lucas, 2018 ; HAL Id: tel-02095733).

traitement des animaux avec un antibiotique ciblant spécifiquement les bactéries anaérobies (métronidazole et clindamycine) (Kontopoulou *et al.*, 2019) ou avec de l'ampicilline (50 mg/kg) (Xenofontos *et al.*, 2022). A contrario, l'administration d'oméprazole, un inhibiteur de pompe à proton utilisé en clinique pour le traitement des ulcères de l'estomac, n'avait aucun effet sur l'établissement de la colonisation par *K. pneumoniae* chez les souris (Xenofontos *et al.*, 2022).

L'utilisation de molécules chimiques, comme le Dextran Sodium Sulfate (DSS) dans le cas de modèle de colite ulcéreuse chez la souris, perturbe également le microbiote et favorise l'implantation de *K. pneumoniae*, ainsi que son potentiel inflammatoire (Lau *et al.*, 2008). Récemment, il a été mis en évidence dans un modèle murin d'inflammation chronique de l'intestin (DSS et azoxyméthane) que l'infection par des souches de *K. pneumoniae* carbapénème résistantes, induit une accumulation excessive de macrophages et une surproduction d'IL-10 (cytokine pro-inflammatoire) ; ce processus exacerbé le potentiel tumorigénique de *K. pneumoniae* en induisant la formation de tumeurs pré-cancéreuses (Chiang *et al.*, 2021) (**Figure 18**). Cette formation de tumeurs pré-cancéreuses est notamment liée à la colibactine, facteur de pathogénicité encodé par l'îlot *pks*, chez *K. pneumoniae* (Lu *et al.*, 2017; Strakova *et al.*, 2021). Chez *E. coli*, la présence de l'îlot *pks*, responsable de la production de colibactine, est associée à la survenue de cancers colorectaux (Faïs *et al.*, 2018) (**Figure 19**). Chez *K. pneumoniae* la présence de cet îlot atteint une prévalence de 25 à 30% dans les génomes de souches hypervirulentes (Faïs *et al.*, 2018; Putze *et al.*, 2009; Lan *et al.*, 2019; Strakova *et al.*, 2021). Comme pour *E. coli*, la production de colibactine par *K. pneumoniae* aurait également une implication dans la formation de lésions précancéreuses au niveau colique (Prorok-Hamon *et al.*, 2014; Payros *et al.*, 2014) ; dans une étude récente, 4 à 27% de patients atteints de cancers colo-rectaux étaient porteurs de *K. pneumoniae pks*-positifs (Strakova *et al.*, 2021).

Afin de mieux comprendre la dynamique de colonisation intestinale par *K. pneumoniae*, c'est-à-dire la cinétique et le tropisme, un nouveau modèle murin de colonisation mimant le schéma clinique des infections a été développé (Sim *et al.*, 2022). Ce modèle consiste en l'inoculation d'une dose de 10^5 UFC d'une souche de *K. pneumoniae* résistante aux carbapénèmes, une semaine avant administration d'un cocktail d'antibiotiques à spectre très large (actif à la fois contre les Gram + et Gram -, aérobies et anaérobies) (ampicilline, vancomycine, néomycine et métronidazole, ANMV) (Simon *et al.*, 2020). L'administration de

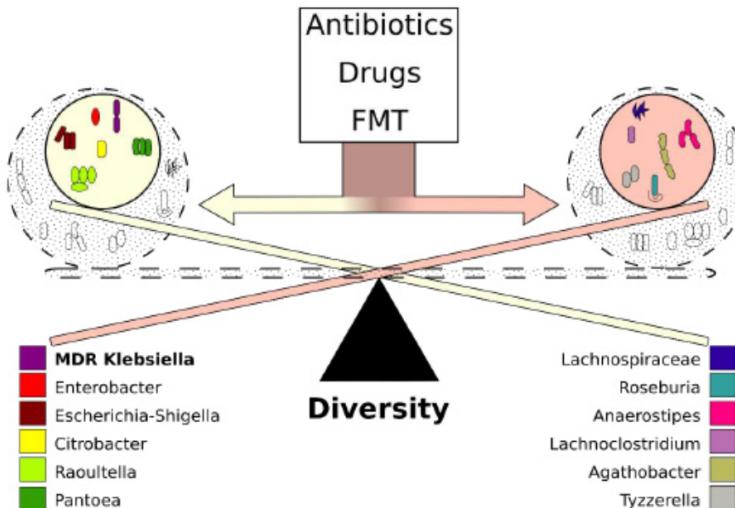


Figure 20. Dynamique du microbiote sous l'action de stress environnementaux : introduction au concept de clusters bactériens inter-exclusifs. La colonisation par *K. pneumoniae* (notamment multi-résistante) est accompagnée par une dérégulation de l'homéostasie du microbiote. Cette colonisation et la dysbiose qui l'accompagne, sont notamment régies par la capacité de l'hôte à répondre à différents stress (prise d'antibiotiques, médicaments, transplantation fécale (FMT)). Sous l'action d'une perturbation, la colonisation par *K. pneumoniae* va modifier la diversité du microbiote de façon exclusive. En effet, la présence de *K. pneumoniae* est à la fois corrélée avec la présence d'autres entérobactéries (**gauche**) et va également exclure la présence de bactéries bénéfiques notamment les producteurs d'AGCC (**droite**). De fait, la présence de ces 2 clusters de bactéries du microbiote est une relation d'exclusivité stricte, et ceux-ci ne peuvent être retrouvés au même moment dans le cas d'une colonisation par une *K. pneumoniae* multi-résistante, soulignant l'importance de l'effet « groupe » au sein du microbiote intestinal (**D'après Juhász et al., 2021**).

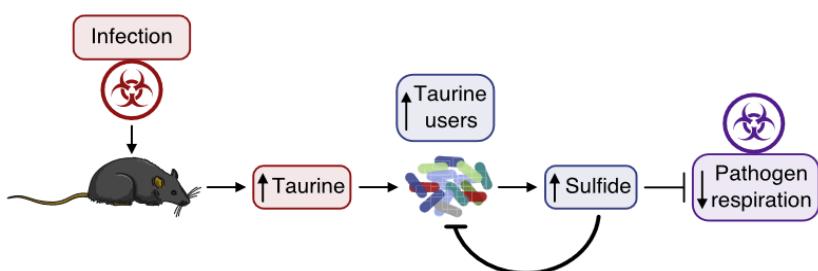


Figure 21. Effet mémoire du microbiote intestinal de souris conditionné par l'infection. Suite à l'infection par un pathogène, l'hôte augmente la production et le transport des acides biliaires. Parmi ces acides biliaires, la taurine, est convertie par les individus du microbiote en sulfide, un composé anti-microbien du fait de sa capacité à inhiber la respiration par les bactéries pathogènes. Cette production augmentée de sulfide est impliquée dans la résistance à la colonisation. Enfin, l'hôte possède également un effet mémoire en « entraînant » le microbiote à produire des sulfides anti-microbiens pour se prémunir des épisodes infectieux ultérieurs (**D'après Stacy et al., 2021**).

ce faible inoculum bactérien ne permet pas de retrouver *K. pneumoniae* au niveau fécal sans traitement. En revanche, l'administration du cocktail ANMV une semaine après cette inoculation permet de retrouver de hauts niveaux de colonisation par *K. pneumoniae* aux niveaux fécal et caecal des souris (10^9 UFC/g). Ces résultats confirment le tropisme préférentiel de *K. pneumoniae* pour le caecum et montre une cinétique de colonisation longue (jusqu'à 1 mois) mais variable selon la charge bactérienne. De plus, la capacité métabolique de la bactérie vis-à-vis du xylose participe à son implantation faisant de la présence de ce sucre un marqueur de susceptibilité de l'hôte favorisant la colonisation par *K. pneumoniae* (Sim *et al.*, 2022). Dans l'étude de Sim *et al.* précitée, la présence de *K. pneumoniae* au niveau intestinal est associée à une diminution significative des représentants de la famille des *Erysipelotrichaceae* chez les souris colonisées, suggérant la mise en place d'une dysbiose (Sim *et al.*, 2022).

3.2.2. Colonisation par *K. pneumoniae* et dysbiose

La présence ou l'absence de certaines familles de microorganismes est corrélée à la colonisation intestinale par *K. pneumoniae*. Juhász *et al.* ont identifié en modèle murin deux groupes bactériens distincts, qui sont augmentés (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Escherichia-Shigella*) ou diminués (*Lachnospiraceae*, *Lachnoclostridium*, *Roseburia*, *Blautia*) (Juhász *et al.*, 2021). Les auteurs introduisent ici un concept de cluster de microorganismes, selon lequel l'impact de plusieurs microorganismes serait plus grand que celui d'espèces individuelles pour inhiber ou au contraire favoriser l'implantation de *K. pneumoniae* (Juhász *et al.*, 2021) (**Figure 20**). De plus, Stacy *et al.*, ont observé une résistance à la colonisation par *K. pneumoniae* chez des souris pré-inoculées par des mutants de *Y. pseudotuberculosis* atténués dans leur virulence ($\Delta yopM$) et pour lesquelles cette pré-infection avait généré une dysbiose. Cette résistance à la colonisation est corrélée avec un enrichissement en delta-protéobactéries et une augmentation du niveau de taurine (acide biliaire primaire) au niveau intestinal. Les delta-protéobactéries sont capables de métaboliser la taurine en sulfides, inhibant la respiration des pathogènes dont *K. pneumoniae*, ce qui expliquerait l'effet anti-colonisation (Stacy *et al.*, 2021) (**Figure 21**). De la même façon, l'administration préalable du probiotique *Lactobacillus plantarum* LP1812 protège également de la colonisation par *K. pneumoniae* en stimulant la production d'acide acétique, un acide gras à chaînes courtes (Yan *et al.*, 2021). Les souris traitées avec la souche probiotique présentent également une

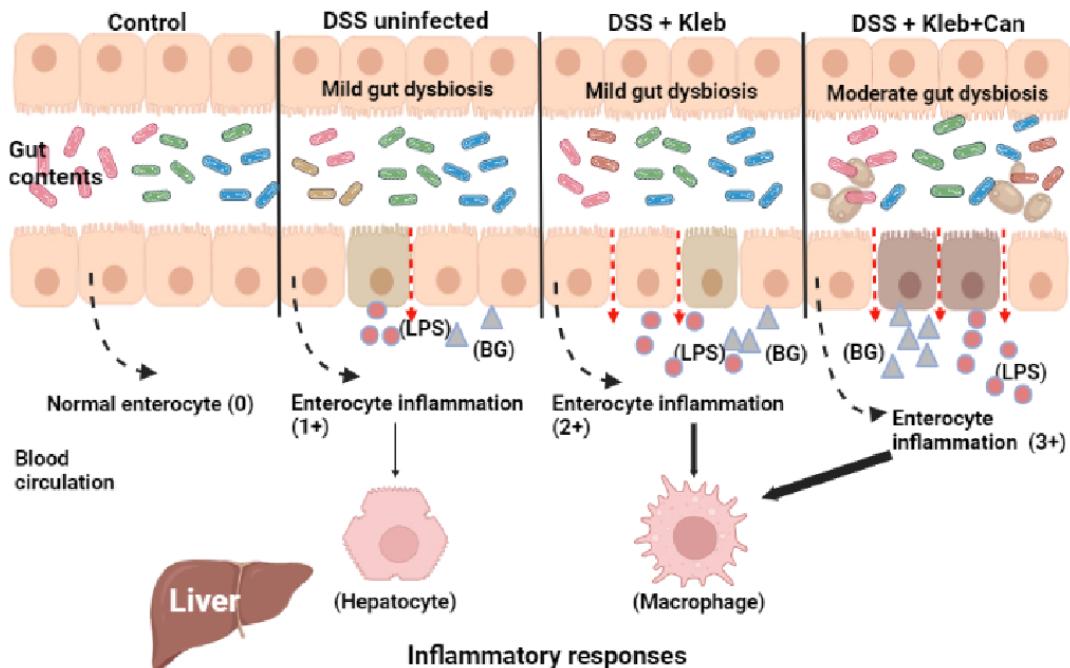


Figure 22. *C. albicans* et *K. pneumoniae* agissent de concert pour agraver l'inflammation intestinale dans un modèle de colite induite au DSS. La colite provoquée par l'administration de DSS entraîne une dysbiose du microbiote intestinal, en parallèle des dommages aux épithélia favorisant la translocation des pathogènes et leur reconnaissance *via* des motifs microbiens (LPS, peptidoglycane (liaisons 1→3-β-D-glucan BG)). La dysbiose est d'autant plus marquée en présence de *C. albicans* et *K. pneumoniae*, bien que la seule présence de *K. pneumoniae* suffise à induire suffisamment d'inflammation pour un recrutement de cellules immunitaires (macrophages et hépatocytes) (D'après Panpatch et al., 2022).

composition du microbiote différente des souris non traitées, avec un enrichissement en bactéries bénéfiques (*Halomanias*, *Bacteroidetes*, *Blautia* et *Holdemania*) productrices d'acide acétique (Yan *et al.*, 2021).

Le rôle, l'importance et la prévalence, des autres composants du microbiote intestinal (virus et champignons) sont souvent négligés dans la littérature. Cependant, *Candida albicans*, un champignon commensal prédominant du microbiote, est fréquemment associé à la présence de *K. pneumoniae* producteurs de carbapénémases au niveau intestinal chez des patients placés en soins intensifs (Papadimitriou-Olivgeris *et al.*, 2014). De la même façon que *K. pneumoniae*, la colonisation par *C. albicans* est retrouvée chez des patients septiques en conditions dysbiotiques, ayant une inflammation intestinale marquée, associée à une antibiothérapie (Gutierrez *et al.*, 2020; Jawhara *et al.*, 2008). Une récente étude a évalué l'impact d'une co-colonisation par *C. albicans* et *K. pneumoniae* sur la perturbation induite au microbiote dans un modèle de souris colite induite au DSS, ainsi que les dégâts épithéliaux retrouvés chez l'hôte (Panpatch *et al.*, 2022) (**Figure 22**). Il est à noter que beaucoup de facteurs confondants existent dans cette étude (*C. albicans*, *K. pneumoniae* et colite provoquée par le DSS). Néanmoins, une aggravation de l'inflammation et de la dysbiose intestinale provoquée par *K. pneumoniae* est observée dans les souris DSS en présence de *C. albicans*. En effet, cette co-infection induit des dommages épithéliaux profonds (inhibition de la synthèse des protéines de jonctions serrées et de la résistance transépithéliale), permettant le passage de signaux bactériens stimulant la production de signaux hyper-inflammatoires au niveau des macrophages et des hépatocytes, conduisant à un choc septique chez les souris (Panpatch *et al.*, 2022).

La présence de *K. pneumoniae* peut avoir un impact important sur la composition d'autres microbiotes humains. En effet, l'instillation intranasale de *K. pneumoniae* (10^4 UFC) entraîne une rapide évolution du microbiome pulmonaire, avec une prédominance de *K. pneumoniae* (majorité à 30h) en lieu et place des *Streptococcus*, majoritaires dans un microbiome de poumons sains (Wolff *et al.*, 2021). De plus, les auteurs précisent que le microbiote oral est un bon reflet du microbiote pulmonaire puisqu'il semble identique dans ces 2 compartiments chez des souris saines. En revanche, l'infection intranasale de *K. pneumoniae* a peu d'impact sur la modulation du microbiote intestinal, bien qu'il existe des différences marquées en termes de production de cytokines pro-inflammatoires avec des

niveaux de TNF- α pulmonaires et sanguins qui augmentent très rapidement après infection (Wolff *et al.*, 2021). A contrario, l'impact du microbiote intestinal sur la réponse inflammatoire à l'infection par *K. pneumoniae* ne peut pas être négligé, comme le suggère le concept d'axe « intestin-poumons ». En effet, l'administration d'un probiotique intestinal *L. plantarum* chez la souris stimule la réponse immunitaire au niveau pulmonaire et permet une réduction de la réponse inflammatoire innée (diminution des neutrophiles et macrophages et cytokines pro inflammatoires IL-6 et TNF- α) lors d'une infection intranasale par *K. pneumoniae*, en comparaison à des souris non traitées par *L. plantarum* (Vareille-Delarbre *et al.*, 2019).

Les microbiotes humains et notamment le microbiote intestinal sont des environnements hautement dynamiques (marqués par des variations de composition et de richesse) où une compétition entre pathogènes et commensaux peut s'établir. Cette compétition est régie notamment par différentes activités métaboliques bactériennes pouvant inhiber ou promouvoir la survie du pathogène. Dans le cas de *K. pneumoniae*, ce processus conduit à une implantation pérenne au sein de la niche écologique, environnement favorable à son développement. De même, les pathogènes peuvent impacter le fonctionnement des cellules eucaryotes de l'hôte afin de moduler leur virulence et favoriser leur implantation. Les systèmes de sécrétion jouent un rôle primordial dans ces actions, en permettant le transport de molécules vers leur environnement extérieur ou directement dans des cellules cibles.

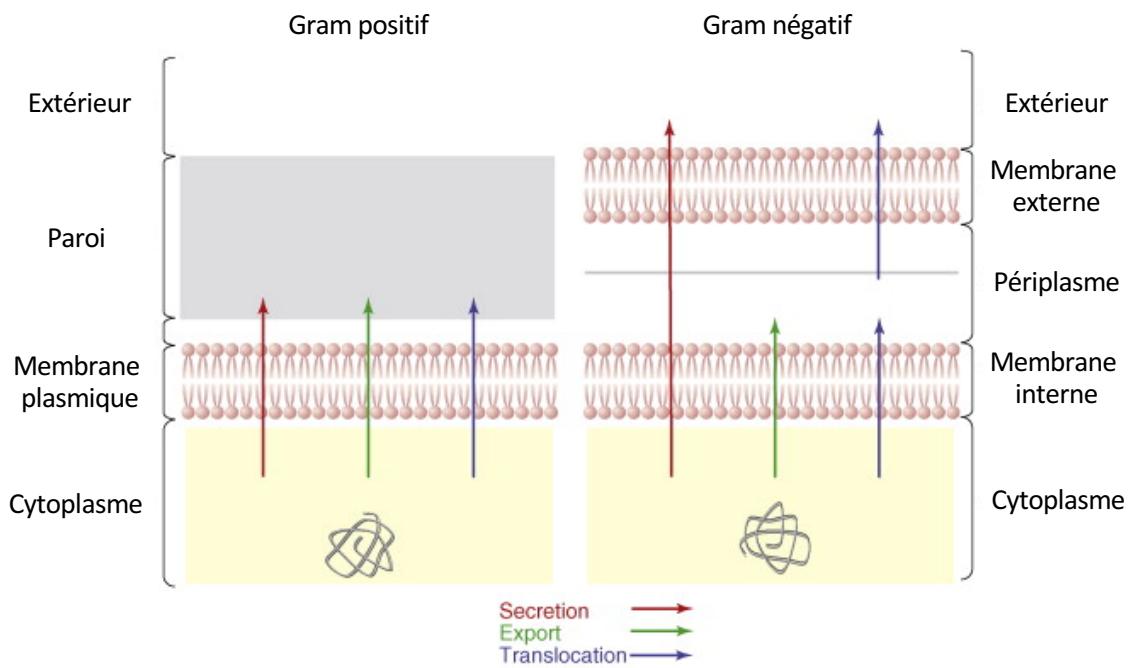


Figure 23. Illustration des phénomènes de sécrétion, translocation et export des protéines chez les bactéries Gram positif (a) et Gram négatif (b). La sécrétion de protéines (rouge) fait référence à un transport actif des molécules depuis le cytoplasme vers l'environnement extérieur. La translocation (bleu) désigne le passage d'une protéine entre deux compartiments distincts. Enfin, l'export (vert) est un terme utilisé pour illustrer le passage du cytosol vers le périplasme (Gram négatif) ou à l'extérieur de la cellule (Gram positif) (**Adapté de Desvaux et al. 2009**).

PARTIE 2 : Le système de sécrétion de type VI

I. La sécrétion des protéines chez les bactéries

La sécrétion de protéines chez les bactéries est un processus essentiel au développement, à la survie, et à l'expression du pouvoir pathogène. Les bactéries pathogènes sécrètent des protéines destinées à i) intoxiquer des cellules cibles pour déréguler leur fonction, ii) piéger des molécules nécessaires à leur développement dans leur environnement extérieur ou encore iii) faciliter leur attachement à des surfaces biotiques ou abiotiques. Plusieurs termes sont utilisés dans la littérature pour décrire le passage de ces protéines, toxines ou enzymes du cytoplasme bactérien vers le périplasme ou l'environnement extérieur. « Sécrétion » désigne le transport actif d'une molécule de l'intérieur de la cellule jusqu'à l'extérieur directement, tandis que « translocation » et « export » font référence à un changement de localisation de la molécule, soit au passage du cytosol vers le périplasme soit du périplasme vers l'extérieur de la cellule, dans le cas d'une bactérie Gram négatif. Il est à noter que les trois termes désignent un seul et même processus dans le cas d'une bactérie Gram positif du fait de la présence d'une seule et unique membrane plasmique (Desvaux *et al.*, 2009) (**Figure 23**).

Le transport de molécules s'effectue également à l'intérieur des cellules bactériennes permettant l'acheminement et la mise en place d'autres protéines entre les différents compartiments, notamment au niveau périplasmique pour les bactéries à Gram négatif. Pour cela, les systèmes de sécrétion général Sec et de translocation Twin Arginin (Tat) sont les plus utilisés par les bactéries.

1. L'export des protéines vers le périplasme

1.1. Le système Sec

Le système Sec est un système très répandu chez la majorité des bactéries à Gram négatif ; c'est un complexe membranaire protéique très conservé, y compris chez les eucaryotes et les archées (Berg *et al.*, 2004). Celui-ci est impliqué dans le transport de protéines de différentes natures.

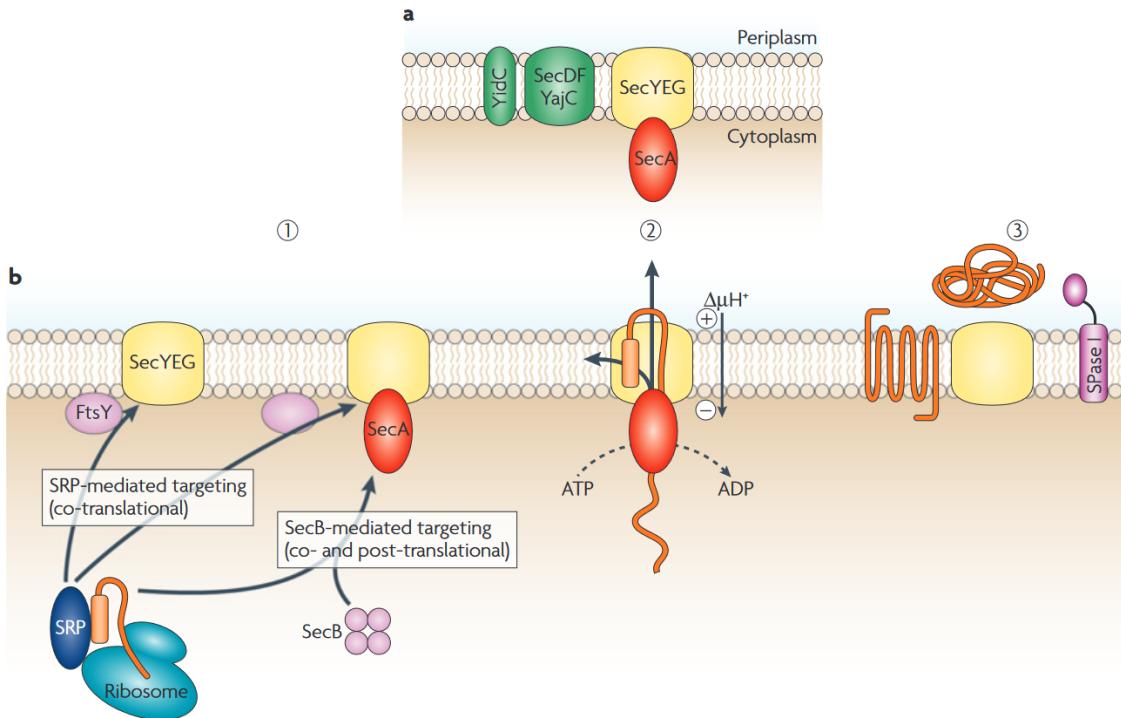


Figure 24. Le système de translocation Sec chez les bactéries. Les éléments constitutants le système de sécrétion Sec au niveau membranaire dont le translocon SecYEG, SecA et YidC sont représentés en (a). Également, SecDF et YajC sont des protéines aidant à la translocation des protéines. (b) La voie SRP (co-traductionnelle) fait intervenir la reconnaissance de la pré-protéine et de son peptide signal par SRP qui va ensuite se lier à FtsY pour adressage au translocon SecYEG. La voie SecB (co- et post-traductionnelle) implique la reconnaissance de la protéine par SecB et complexage avec SecA (étape 1). La translocation est ensuite réalisée via le translocon SecYEG, l'énergie étant fournie par fixation et hydrolyse de l'ATP par l'ATPase SecA ainsi que la force proto motrice ($\Delta\mu H^+$) (étape 2). Enfin, la protéine une fois transloquée est soit ancrée à la membrane par l'intermédiaire de YidC, ou relarguée dans l'espace périplasmique après clivage du peptide signal (SPaseI) (étape 3) (D'après Papanikou *et al.* 2007).

Le système Sec est composé de 3 sous unités protéiques : le complexe pré-protéique à transporter, une ATPase motrice SecA, qui fournit l'énergie nécessaire pour la translocation sous forme d'ATP en parallèle de l'utilisation de la force proto-motrice, et le complexe majeur transmembranaire appelé translocon SecYEG. La translocation d'une protéine *via* le système Sec commence par la formation d'un complexe pré-protéique qui peut être pris en charge de deux façons :

i) la voie SRP dépendante utilisée pour transloquer les protéines destinées à être ancrées à la membrane interne, où le complexe pré-protéique est reconnu *via* un peptide signal spécifique par une molécule SRP (Signal Recognition Particle) dans le cytoplasme. La molécule SRP est composée d'un petit ARN attaché à une protéine appelée Ffh qui reconnaît la pré-protéine en même temps que celle-ci quitte le ribosome (processus co-traductionnel) (Luirink and Sinning, 2004; Chatzi *et al.*, 2013). Ce complexe ribonucléique est ensuite reconnu par FtsY, le récepteur de SRP ancré à la membrane, et transféré au translocon SecYEG. Une fois la traduction terminée, la protéine quitte latéralement le translocon pour s'ancrer dans la membrane interne à son tour à l'aide de YidC (**Figure 24**).

ii) la voie SecB-dépendante, fait intervenir la chaperonne SecB, qui empêche un repliement précoce avant translocation et permet la translocation de protéines à localisation finale périplasmique ou extracellulaire (Papanikou *et al.*, 2007). La protéine native composée d'au moins 150 acides aminés, est reconnue par SecB de façon post-traductionnelle par des liaisons de type hydrophobe, ce qui empêche son repliement pour faciliter le passage dans le translocon. Ce complexe est ensuite reconnu par SecA (une chaperonne cytoplasmique) et adressé au translocon SecYEG pour translocation membranaire de la protéine. Si la pré-protéine ne nécessite pas d'interaction avec SecB pour empêcher son repliement, celle-ci est directement amenée par SecA au translocon SecYEG. Enfin, SecA fournit l'énergie sous forme d'ATP pour la translocation et le passage de la protéine dans le translocon. Après passage au travers de SecYEG, les peptidases clivent le peptide signal et la protéine mature est relâchée dans l'espace périplasmique (Beckwith, 2013; Chatzi *et al.*, 2013; Green and Mecsas, 2016; Tsirigotaki *et al.*, 2017) (**Figure 24**).

Ainsi plusieurs espèces bactériennes à Gram négatif utilisent des sécrétions Sec-dépendantes pour transporter des protéines à travers leur membrane interne (*Vibrio*

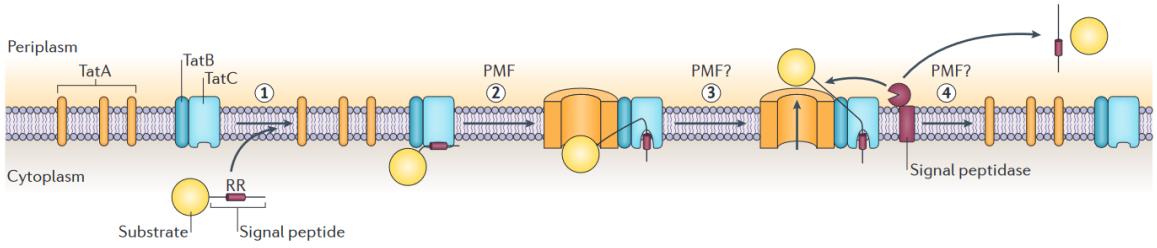


Figure 25. Le système de translocation Tat chez les bactéries. L'initiation de la translocation du substrat protéique (rond jaune) commence par la reconnaissance du peptide signal au motif double arginine (RR) par TatC (bleu clair) et la liaison du substrat au complexe protéique TatBC transmembranaire (étape 1). La force protomotrice (PMF) permet d'ancrer solidement la liaison du peptide signal au complexe TatBC, et également le recrutement et la polymérisation de TatA (orange), résultant en un complexe TatABC complètement fonctionnel (canal TatA). La protéine passe ensuite dans ce canal, le peptide signal restant ancré au niveau de TatBC (étape 3). Enfin, la peptidase signal (violet) clive la protéine au niveau du peptide signal et la protéine est relarguée dans l'espace périplasmique (étape 4) (D'après Palmer and Berks, 2012).

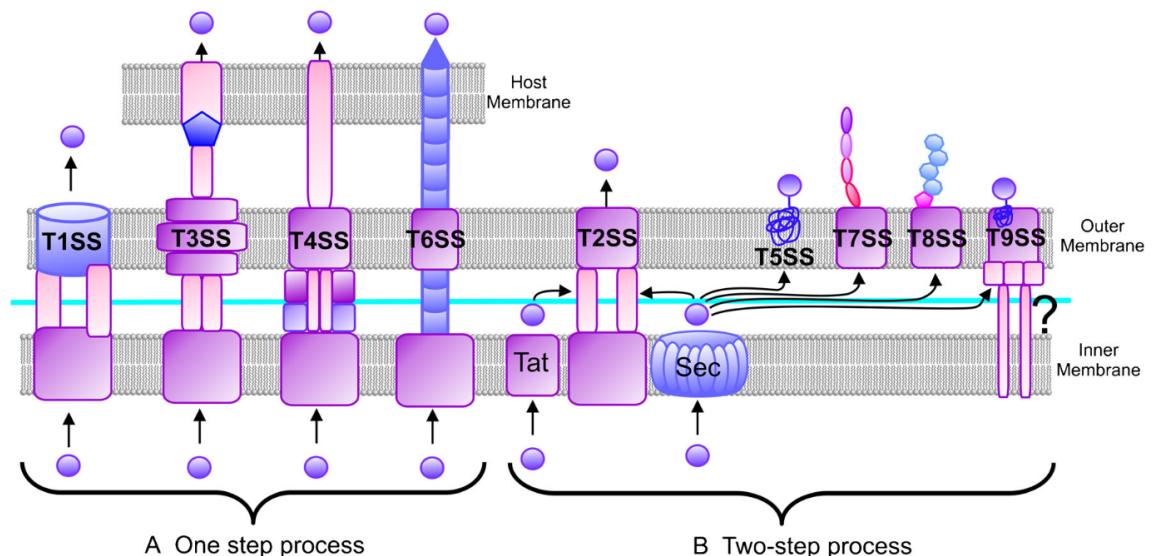


Figure 26. Les différents systèmes de sécrétion chez les bactéries Gram négatif. Les systèmes de sécrétion sont répartis en deux groupes, les systèmes n'impliquant qu'une étape pour la sécrétion des protéines, délivrant directement la protéine du cytosol à l'environnement extérieur (SST1, SST3, SST4 et SST6) (**A**) et les systèmes dépendants de Sec et Tat, nécessitant une translocation périplasmique des exoprotéines par ces systèmes avant sécrétion (SST2 (pili type IV), SST5 (autotransporteurs), SST7, SST8 (formation de curli) et SST9) (**B**) (D'après Bocian-Ostrzycka et al., 2017).

cholerae, *Yersinia enterocolitica*, *K. pneumoniae*). Des systèmes homologues (SecA2/SecY2) ont été décrits chez certains pathogènes Gram positif (*Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp.) et sont impliqués dans le transport des glycoprotéines riches en sérine (adhésines impliquées dans la virulence) (Green and Mecsas, 2016; Freudl, 2013).

1.2. Le système Tat

Contrairement au système Sec, le système de transport Tat « Twin Arginine Translocation » transmembranaire prend en charge des protéines repliées dans leur conformation finale. Ce transport ne nécessite en outre aucune utilisation d'ATP mais repose seulement sur l'utilisation de la force protomotrice (Patel *et al.*, 2014). Les protéines transloquées, à partir du cytoplasme *via* le système Tat, possèdent en N-terminal un peptide signal très spécifique de séquence conservée avec un motif S-R-R-x-F-L-K, où R-R est une double arginine (Twin Arginine), suivi d'un acide aminé polaire X (Müller, 2005). Initialement, la protéine produite est reconnue *via* son peptide signal situé en N-terminal par TatBC, un complexe membranaire. TatBC, lié au substrat protéique, est ainsi pris en charge par le canal transmembranaire TatA et la protéine est alors transloquée dans l'espace périplasmique, puis subit un clivage au niveau du peptide signal Ala-x-Ala (Palmer and Berks, 2012) (**Figure 25**). Ce système est prépondérant chez les bactéries Gram négatif, mais est aussi présent et fonctionne de la même manière chez les bactéries Gram positif (Freudl, 2013).

2. Les systèmes de sécrétion

Chez les bactéries, neuf systèmes de sécrétion sont actuellement répertoriés, du type I (SST1) au type IX (SST9), chacun jouant un rôle différent dans la pathogénicité et la virulence. Certains de ces systèmes (SST2, SST5, SST7, SST8 et SST9) sont dépendants du système de translocation Sec ; les protéines subissent alors deux étapes de sécrétion. D'autres sont Sec-indépendants (SST1, SST3, SST4) ; les protéines sont directement sécrétées dans le milieu extracellulaire ou dans une cellule cible (Tsirigotaki *et al.*, 2017) (**Figure 26**). Ces systèmes de sécrétion sont de véritables outils moléculaires retrouvés en majorité chez les bactéries Gram négatif, mais certains sont aussi décrits chez les bactéries Gram positif et permettent au pathogène d'accroître, directement ou indirectement, sa capacité à survivre et à se multiplier dans l'hôte et/ou son environnement (Chagnot *et al.*, 2013). C'est le cas du SST7, codé par un opéron ESX, impliqué dans un ensemble de processus bactériens comme la conjugaison, mais

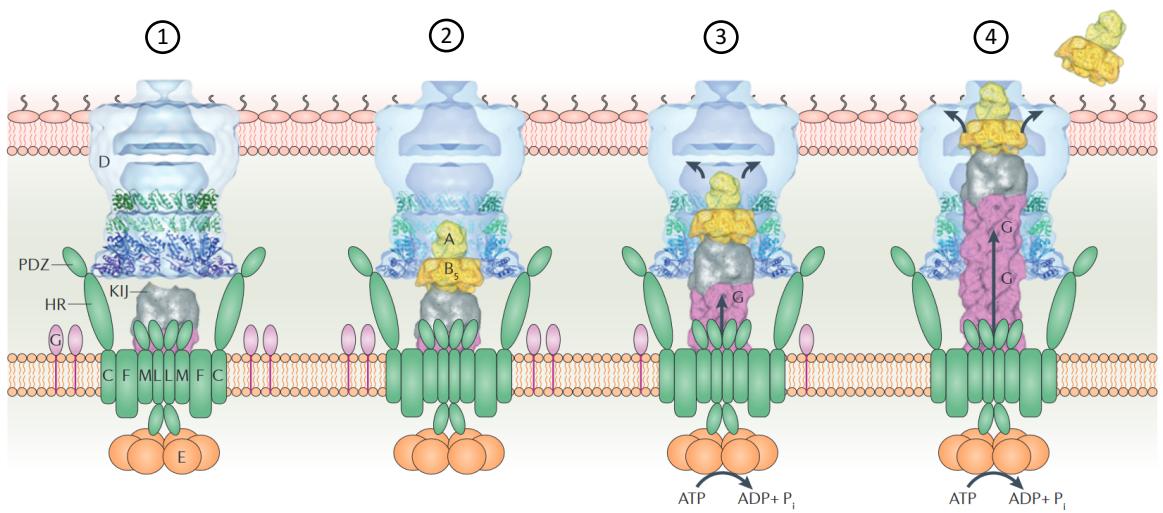


Figure 27. Principe de fonctionnement du système de sécrétion de type II (SST2). Chaque lettre X correspond à la protéine GspX associée constituant le SST2, selon la nomenclature universelle Gsp adoptée pour le SST2. Les 3 sous-unités majeures du SST2 sont représentées en orange (GspE (ATPase)), vert (plateforme de la membrane interne) et bleu ciel (sécrétine de la membrane externe, GspD). A son état basal avant fixation d'une exoprotéine, le SST2 est représenté en (1). Ici l'exemple de la sécrétion de la toxine AB₅ de *Vibrio cholerae* (jaune et orange) est représenté, séquestrée dans l'espace périplasmique (2). Après reconnaissance de la toxine par la sécrétine et / ou GspC, l'ATPase GspE reçoit une cascade de signaux induisant l'hydrolyse de l'ATP et un changement de conformation de l'hexamer GspE (3). Les différentes pré-pillines GspG (violet) situées au niveau de la membrane interne sont alors recrutées au fur et à mesure par GspL (vert) et assemblées pour former le piston poussant le complexe GspKIJ (gris) portant la toxine AB₅ et conduisant à la sécrétion de celle-ci à travers la sécrétine, qui s'ouvre après contact avec l'exoprotéine (flèches noires) (4) (Adapté de Korotkov et al., 2012).

aussi dans la stabilité de la paroi (Sysoeva *et al.*, 2014). Il a été montré que ce système est impliqué dans l'établissement et le maintien d'une infection pour les pathogènes *S. aureus* et *Mycobacterium tuberculosis* (Burts *et al.*, 2005; Fortune *et al.*, 2005). Chez *M. tuberculosis*, plusieurs SST7 ont été décrits (ESX1-5). Le SST7 semble être lié à la présence d'une mycomembrane supplémentaire chez *Mycobacterium*, qui pourrait ainsi servir à l'export spécifique de certaines protéines. D'autres systèmes voisins du SST7 ont été également identifiés chez des Gram positif ne possédant pas de mycomembranes comme chez *L. monocytogenes* ou *B. anthracis* (Green and Mecsas, 2016). Chez les bacilles Gram négatifs, ce système SST7 est aujourd'hui classé dans la voie des chaperones-ushers (Khater *et al.*, 2015). Dans la suite de cette partie, seuls les systèmes de sécrétion présents chez *K. pneumoniae* seront présentés.

2.1. Le système de sécrétion de type II (SST2)

Le SST2 est Sec-dépendant et a longtemps été considéré comme la partie terminale du système Sec, puisque les protéines sécrétées *via* le SST2 dans le milieu extérieur nécessitent d'être acheminées dans le périplasme *via* le système Sec (ou le système Tat). L'architecture du SST2 s'organise autour de 15 protéines regroupées en 3 sous-unités majeures : i) le complexe appelé sécrétine, ancré à la membrane externe (un dodécamère protéique en forme cylindrique), ii) la plateforme localisée dans la membrane interne, support du pseudopili et iii) l'ATPase de sécrétion. Chaque protéine constituant le SST2 est annotée suivant une nomenclature universelle « Gsp » (General Secretion Pathway) propre au SST2. L'ordre d'assemblage du SST2 ainsi que le mode d'action exact de celui-ci reste encore mal compris, mais Korotkov *et al.* proposent un mode de fonctionnement type « piston » : une fois que la protéine d'intérêt est transférée au périplasme par le système Sec ou Tat, celle-ci est séquestrée entre la sécrétine et la plateforme interne. Ces 2 sous-unités interagissent entre elles *via* GspC et induisent ainsi l'hydrolyse de l'ATP grâce à l'ATPase GspE. L'énergie fournie sert à incrémenter la formation du pseudopili par recrutement de plusieurs pré-pillines GspG, nécessaire au soutien de la structure GspKIJ en forme de piston. Cette conformation du SST2 permet ensuite le passage de la protéine d'intérêt dans le pore formé par la sécrétine GspD puis son excrétion vers l'extérieur de la cellule (Korotkov *et al.*, 2012) (**Figure 27**).

Plusieurs espèces pathogènes Gram négatif utilisent le SST2 pour la sécrétion d'enzymes et/ou de toxines pour s'adapter à leur environnement. Ainsi, chez *Acinetobacter baumanii* et *Acinetobacter nosocomialis*, des mutants délétés du gène codant la sécrétine ($\Delta gspD$) sont déficients pour la colonisation des épithélia pulmonaires chez la souris (Elhosseiny *et al.*, 2016; Harding *et al.*, 2016). Ces mutants sont également déficients dans la colonisation du foie et de la rate dans un modèle murin de bactériémie (Johnson *et al.*, 2016). Chez *Legionella pneumophila*, le SST2 est essentiel pour l'infection des macrophages humains *in vitro*. La production d'une endochitinase (ChiA), par le biais du SST2, jouerait un rôle direct dans la colonisation des épithélia pulmonaires chez la souris, puisqu'un mutant chitinase-déficient est rapidement éliminé *in vivo*. La survie réduite des mutants déficients pour la synthèse du SST2 chez *L. pneumophila* dans les poumons serait due à l'incapacité des bactéries à infecter les macrophages résidents (Cianciotto, 2013). Cette même protéine ChiA a été également identifiée chez *E. coli* K-12, comme sécrétée *via* le SST2, et son expression est inhibée par les protéines H-NS (Histone-like Nucleoid-Structuring) (Francetic *et al.*, 2000). Le SST2 a également été incriminé dans la sécrétion de toxines essentielles à l'expression du pouvoir pathogène. Tauschek *et al.*, ont montré le rôle essentiel de la sécrétion SST2-dépendante de l'entérotoxine thermolabile (LT), caractéristique chez les souches de *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC) (Tauschek *et al.*, 2002). De façon intéressante, la toxine responsable du choléra (CT) synthétisée par *V. cholerae*, homologue à plus de 77% à la toxine LT produite par les ETEC, est également sécrétée par le SST2 (Sandkvist *et al.*, 1997; Francetic *et al.*, 2000). Enfin, les pili de type IV sont également assemblés *via* le SST2. Ces pili sont impliqués dans l'interaction cellule-cellule, la motilité de type twitching, l'adhésion aux surfaces et la formation de biofilms (Bose *et al.*, 2002; Paranjpye and Strom, 2005). Ils sont impliqués dans l'adhésion initiale lors de la formation de biofilms, mais également dans la virulence des UPEC et la capacité des bactéries à coloniser les reins chez la souris (Kulkarni *et al.*, 2009).

Chez *K. pneumoniae*, le SST2 a été décrit comme le système Pul, et est impliqué dans la sécrétion d'une pullulanase (PulA) (Pugsley *et al.*, 1990). La pullulanase est une lipoprotéine capable de dégrader les liaisons $\alpha(1-6)$ des résidus amyloïdes pour utiliser ceux-ci en tant que source de carbone ; c'est le cas de la pullulane, un polymère de maltotriose lié par des liaisons $\alpha(1-6)$. La pullulanase étant trop imposante pour diffuser directement à travers la membrane externe, celle-ci est d'abord ancrée à la membrane externe puis progressivement relâchée

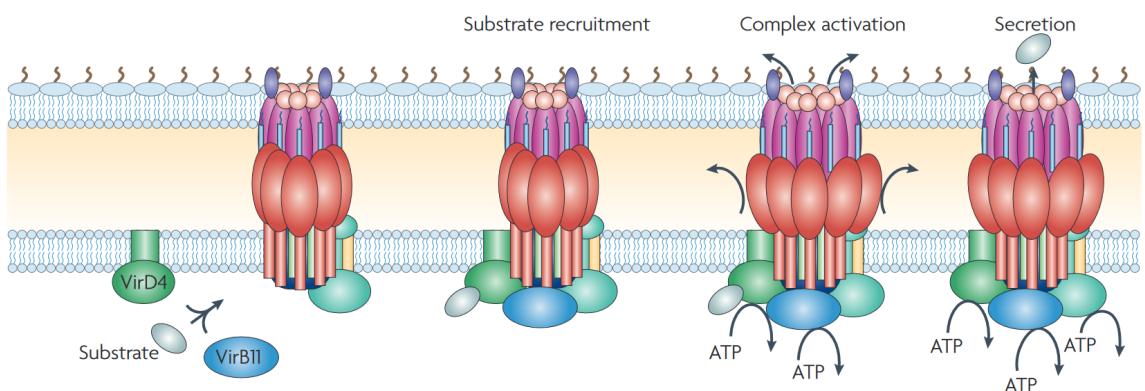


Figure 28. Principe de fonctionnement du système de sécrétion de type IV (SST4). Chaque protéine VirBX correspond aux différentes protéines du SST4 selon la nomenclature universelle VirB/VirD adoptée pour le SST4 de *A. tumefaciens*. Le complexe ATPase est formé des protéines VirB4, VirB11, VirD4 et ce complexe situé à la membrane interne permet de fournir l'énergie pour la translocation des exoprotéines ou du substrat ADN. VirD4 est également impliqué dans la reconnaissance et le recrutement des protéines ou de l'ADN avant leur sécrétion par le canal. VirB11 interagit ensuite avec la plateforme de la membrane interne entraînant l'activation de l'ensemble du complexe SST4 ; la protéine ou le matériel génétique est ensuite sécrété (**Adapté de Fronzes et al., 2009**).

dans le milieu extérieur (Pugsley *et al.*, 1990; Bender and Wallenfels, 1966). Il apparaît que la sécrétion de cette pullulanase est fonction de l'expression de l'opéron *Pul*, sous contrôle de l'activation par le maltose et d'une répression par le glucose (Pugsley *et al.*, 1997; Chapon and Raibaud, 1985). Rachid, Ebringer et Wilson ont identifié une relation de cause à effet entre un régime riche en amidon et la présence de *K. pneumoniae* productrices de pullulanases au niveau du microbiote intestinal. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'amidon n'est pas digéré par le petit intestin et se retrouve utilisable en grande quantité dans le colon. Cette source de sucres est alors facilement assimilable par certaines bactéries dont la croissance est favorisée, dont *Klebsiella spp.* (Van Laere *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent un rôle de *K. pneumoniae* dans le développement de la maladie cœliaque (Rashid *et al.*, 2013). Enfin, Tomás et al., ont démontré le rôle immunomodulateur de la pullulanase *in vitro* et *in vivo* et la survie de la bactérie dans les poumons de souris et la dissémination au foie et à la rate après infection intranasale (Tomás *et al.*, 2015).

2.2. Le système de sécrétion de type IV (SST4)

Le SST4 est un système protéique très répandu et très complexe de translocation de molécules de plusieurs natures. Dans cette partie, seul le SST4 chez les bactéries Gram négatif sera discuté. Les diverses fonctions biologiques reliées au SST4 sont la conjugaison, la translocation d'effecteurs et l'export / import de matériel génétique. Ces phénotypes ont tout d'abord été utilisés pour classer les différents types de SST4 (Chandran Darbari and Waksman, 2015). Cependant, comme plusieurs fonctions sont partagées par des SST4 d'architectures différentes, ceux-ci ont ensuite été divisés en deux groupes phylogénétiquement distincts chez les bactéries Gram négatif de par leur structure (Alvarez-Martinez and Christie, 2009). Les SST4a type VirB/VirD4, majoritairement étudiés chez *Agrobacterium tumefaciens*, sont composés de 12 protéines (nommées VirB1 à VirB11 et VirD4 dont la nomenclature a été adaptée de façon universelle à tous les SST4) codées par un opéron *virB/trw* situé sur un plasmide (R388). Ces différentes sous-unités peuvent être regroupées selon leur fonction ou leur localisation : les composants de l'ATPase cytoplasmique (VirB4, VirB11, VirD4), les composants de la plateforme de la membrane interne (VirB3, VirB6, VirB8), les protéines constituant le complexe de la membrane externe (VirB7, VirB9, VirB10) et enfin la structure pilus-like (VirB1, VirB2, VirB5) (Grohmann *et al.*, 2018) (**Figure 28**). Le SST4b est représenté par le complexe Dot/Icm retrouvé chez *L. pneumophila* et est composé de plus de 25 protéines

nécessaires à son assemblage. Seules quelques sous-unités sont similaires entre SST4a et SST4b puisque la majorité des protéines composant les SST4b sont spécifiques à celui-ci, et encodées par l'opéron Dot (Nagai and Kubori, 2011). À la vue de la complexité de la classification des différents SST4 et des points de divergence dans la littérature, chaque bactérie pathogène semble synthétiser des SST4s qui lui sont propres.

La conjugaison médiée par le SST4 représente le champ d'investigation le plus large dans la littérature. Des phénomènes de conjugaison ont été démontrés, majoritairement chez *E. coli*, avec la biosynthèse du pili F encodé par un plasmide de type F conjugal, fonctionnellement relié au SST4, et également présent chez *A. tumefaciens* (Alvarez-Martinez and Christie, 2009; De La Cruz *et al.*, 2010; Cabezón *et al.*, 2014). De même, le SST4 est considéré comme un facteur de pathogénicité majeur pour un ensemble de bactéries Gram négatif pathogènes, notamment par sa capacité à favoriser l'internalisation dans les cellules, dans le cas de pathogènes intracellulaires facultatifs (i. e. *Neisseria gonorrhoeae*). Cette virulence est soit médiée par la capacité des pathogènes à sécréter ou importer de l'ADN depuis une cellule ou son environnement extérieur comme il a été montré chez *N. gonorrhoeae* ou encore chez *Helicobacter pylori*, mais également par la sécrétion de toxines et d'enzymes modulant l'interaction hôte-pathogènes (inflammation, formation de biofilm, inhibition de l'apoptose...) (Christie and Cascales, 2005; Gonzalez-Rivera *et al.*, 2016; Grohmann *et al.*, 2018; Sgro *et al.*, 2019). La présence de gènes codant potentiellement des SST4s chez *K. pneumoniae* a été rapportée uniquement deux fois dans la littérature. Medrano et Bell ont mis en évidence la présence de gènes codant la protéine Kpt située sur un plasmide pKp5-1 d'une souche *K. pneumoniae* isolée d'insecte (punaise verte). Cette protéine est fortement homologue aux unités Tra synthétisées par le système conjugal médié par le plasmide F retrouvé chez *E. coli*. De plus, ce cluster de gènes *kpt* (45kb) code des protéines similaires à 86% au SST4 de *Yersinia pestis*. De façon intéressante, de fortes similarités ont été observées en comparant les séquences du plasmide pKp5-1 et celles de plasmides de tailles similaires mis en évidence chez 9 autres souches de *Klebsiella* dont des souches cliniques. Ces résultats sont en faveur de la présence d'un SST4 chez *K. pneumoniae* (Medrano and Bell, 2017). Lee et Choi ont également identifié une portion de 13kb sur un plasmide pKPBHS25-2 chez une souche de *K. pneumoniae* multi-résistante, contenant des gènes impliqués dans la synthèse des pili de type IV (Lee and Choi, 2021).

2.3. Le système de sécrétion de type VI (SST6)

Le SST6 est le troisième système de sécrétion identifié chez *K. pneumoniae*. Les parties suivantes discutent en profondeur l'état de l'art sur les connaissances liées au système de sécrétion de type VI.

II. Le système de sécrétion de type VI (SST6)

Le SST6 a été décrit pour la première fois en 2006 chez la souche de *Vibrio cholerae* V52 responsable d'une épidémie de choléra au Soudan en 1968 (Pukatzki *et al.*, 2006). Dans cette bactérie, un ensemble de gènes « VAS » (Virulence-Associated Secretion) regroupés en opéron a été identifié comme impliqué dans la virulence en utilisant comme modèle des amibes du genre *Dictyostelium*. Après création d'une banque de mutants par insertion de transposons, les mutants délétés pour les gènes *vasA*, *vasK* et *vasH* ont montré une moindre cytotoxicité vis-à-vis de *Dictyostelium discoideum* et de macrophages murins J774 en culture, de manière contact dépendante. Ce système VAS est également essentiel à la sécrétion des protéines Hcp (Hemolysin Coregulated Protein, co-exprimées avec une hémolysine HlyA) (Williams *et al.*, 1996) et VgrG (Valine-Glycine Repeat protein G), possédant un domaine de liaison à l'actine homologue à celui présent dans une toxine RTX, impliquée dans la toxicité vis-à-vis de cellules eucaryotes chez *V. cholerae* (Sheahan *et al.*, 2004). Avant cette étude, seulement 5 systèmes de sécrétion étaient décrits (SST1-5), et au vu de l'organisation en opéron des gènes VAS, de leur implication dans la virulence et de leur implication dans la sécrétion de certains effecteurs, Pukatzki *et al.* attribuèrent à cet opéron le terme de SST6. Des gènes homologues à ceux de l'opéron *vas* avaient été préalablement décrits chez d'autres entérobactéries. C'est le cas notamment du gène *icmF*, homologue à *vasK*, déjà identifié dans d'autres protéobactéries comme faisant partie d'un opéron IAHP (IcmF-associated homologous protein) comprenant 15 gènes codant des protéines impliquées dans la sécrétion (Das and Chaudhuri, 2003). Dans la continuité, Mougous *et al.* ont montré que les protéines Hcp présentes chez *P. aeruginosa* jouent un rôle prépondérant dans les infections chroniques : cette protéine a été mise en évidence dans les sécrétions pulmonaires de patients atteints de

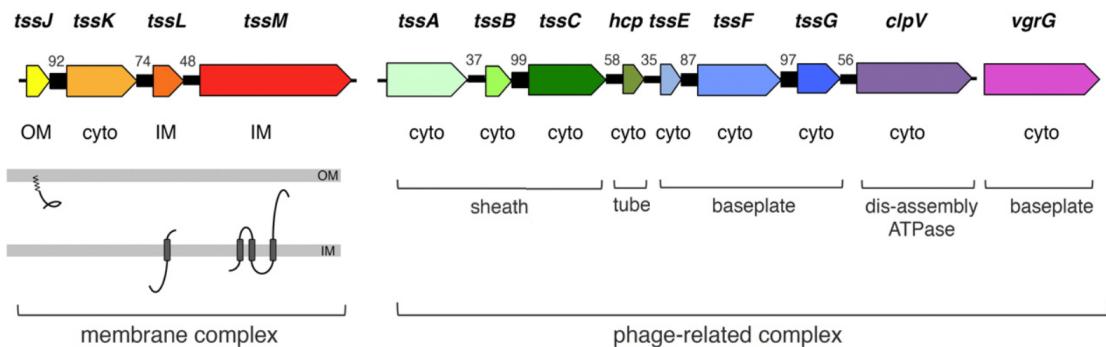


Figure 29. Organisation génomique du SST6. Les 13 gènes cores du SST6 sont nommés selon la nomenclature Tss (Type Six Secretion) (*tssA-M*) et sont séparés en 2 groupes : les gènes appartenant au complexe membranaire (gauche) et les gènes dérivés de bactériophages, permettant l'assemblage de la queue contractile (droite) (à noter que *clpV* n'est pas homologue aux gènes phagiques, mais classé dans cette catégorie du fait de son interaction avec *tssB* et *tssC*). Parmi les gènes impliqués dans la synthèse de la queue contractile, les différents constituants et leur localisation sont également reportés selon la nomenclature liée aux phages (sheath, tube, baseplate). La localisation finale des protéines synthétisées par chaque gène est indiquée en dessous de celui-ci (OM : outer membrane ; cyto : cytoplasm ; IM : inner membrane) (Adapté de Zoued *et al.*, 2014)

Tableau 1. Nomenclature Tss conservée des gènes du SST6.

Nom du gène	Alternative	Emplacement / Role	Domaine COG	Nom correspondant dans les autres espèces		
				<i>S.Typhimurium</i>	<i>V.cholerae</i>	<i>R. leguminosarum</i>
<i>tssA</i>		Polymérisation queue contractile	COG3515	<i>sciA</i>	<i>vasI/vasL</i>	<i>impA</i>
<i>tssB</i>		Queue contractile	COG3516	<i>sciH</i>	NA	<i>impB</i>
<i>tssC</i>		Queue contractile	COG3517	<i>sciL</i>	NA	<i>impC/impD</i>
<i>tssD</i>	<i>hcp</i>	Seringue interne	COG3157	<i>sciK/sciM</i>	<i>hcp</i>	NA
<i>tssE</i>		Plaque de base (BP)	COG3518	<i>sciD</i>	NA	<i>impF</i>
<i>tssF</i>		Plaque de base (BP)	COG3519	<i>sciC</i>	<i>vasA</i>	<i>impG</i>
<i>tssG</i>		Plaque de base (BP)	COG3520	<i>sciB</i>	<i>vasB</i>	<i>impH</i>
<i>tssH</i>	<i>clpV</i>	AAA+ ATPase / recyclage des composants	COG0542	<i>sciG</i>	<i>vasG</i>	NA
<i>tssl</i>	<i>vgrG</i>	Pointe perforante	COG3501	<i>vrgS</i>	<i>vgrG</i>	NA
<i>tssJ</i>		Complexe membranaire (MC)	COG3521	<i>sciN</i>	<i>vasD</i>	NP
<i>tssK</i>		Plaque de base (BP)	COG3522	<i>sciO</i>	<i>vasE</i>	<i>impJ</i>
<i>tssL</i>	<i>icmH</i>	Complexe membranaire (MC)	COG3455	<i>sciP</i>	<i>vasF</i>	<i>impK</i>
<i>tssM</i>	<i>icmF</i>	Complexe membranaire (MC)	COG3523	<i>sciS</i>	<i>vasK</i>	<i>impL</i>
<i>tagD</i>	PAAR	Pointe perforante / association avec VgrG	COG4104	NA	NA	NA
<i>tagA</i>		(Accessoire): Polymérisation queue contractile	COG5351	NA	NA	NA
<i>tagL</i>	<i>sciZ</i>	(Accessoire): Ancrage au peptidoglycane		NA	NA	NA

mucoviscidose, en parallèle de la production d'anticorps anti-Hcp dans leur sérum (Mouguous *et al.*, 2006).

Le SST6 est présent chez plusieurs espèces de bactéries Gram négatif, avec une forte représentation au sein des alpha-, gamma- et beta-protéobactéries et également chez les *Bacteroidetes*. La prévalence du SST6 au sein des protéobactéries est estimée à plus de 25% (Bingle *et al.*, 2008; Cherrak *et al.*, 2019; Coulthurst, 2019; Zoued *et al.*, 2014). La prévalence du SST6 chez *K. pneumoniae* est estimée entre 17 et 95% selon les études. De plus, il existe une corrélation entre la présence du SST6 et le phénotype hypervirulent des souches de *K. pneumoniae* (sérotype capsulaire K1 / K2, production d'une capsule plus développée, et production d'aérobactine), soulignant le haut potentiel pathogène associé au SST6 (Hsieh *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2022; Liao *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2020).

En 2009, une analyse *in silico* mit en évidence que le SST6 n'était pas présent uniquement chez les bactéries pathogènes animales, puisque les auteurs ont réussi à identifier des îlots apparentés au SST6 chez des bactéries pathogènes ou symbiontes des plantes (i. e. *Pseudomonas spp.*) et des bactéries marines (i. e. *Vibrio spp.*) (Boyer *et al.*, 2009; Bernal *et al.*, 2017, 2018).

1. Organisation génomique

L'architecture du SST6 d'un point de vue génomique est très spécifique et comporte à la fois des gènes « cores » et des gènes « accessoires » organisés en opéron appelé « îlots de pathogénicité » (PAI). La présence de 13 core gènes (*tssA-M*) est essentielle pour la synthèse et la mise en place du SST6. Ces gènes sont séparés en deux groupes distincts selon leur fonction : les composants du complexe membranaire et les composants de la queue contractile apparentée à celle des phages (Boyer *et al.*, 2009; Zoued *et al.*, 2014) (**Figure 29**). La nomenclature Tss (Type Six Secretion) a été adoptée en 2007, afin de normaliser le nom des gènes ayant des homologies de séquences et de fonctions dans différentes bactéries (*vasX* chez *V. cholerae*, *sciX* chez *S. Typhimurium*, *impX* chez *Rhizobium leguminosarum*...) (Boyer *et al.*, 2009; Shalom *et al.*, 2007) (**Tableau 1**). Aux gènes *tssX*, viennent s'ajouter les gènes *tagX* (Tss-associated genes) qui sont des gènes accessoires au SST6, pouvant eux-mêmes être divisés en trois catégories suivant les protéines qu'ils codent : i) les composants essentiels à l'assemblage, ii) les sous-unités régulatrices contrôlant l'expression et l'activité et iii) les

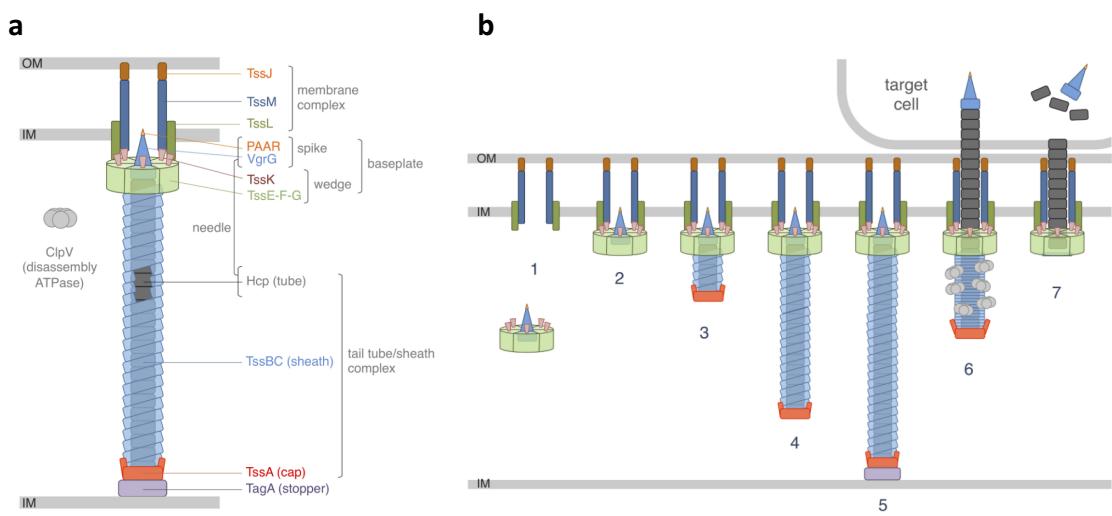


Figure 30. Organisation structurale du SST6. Le SST6 se présente sous la forme d'une aiguille à tête perforante (PAAR & VgrG) composée de 3 sous-unités majeures : le complexe membranaire, la plaque de base et le complexe formant la queue contractile (**a**). Son assemblage (**b**) débute par la synthèse du complexe membranaire enchaîné dans l'espace périplasmique (TssJLM) et de la plaque de base (TssEFGK) (1), elle-même ensuite ancrée au complexe membranaire via TssK (2). Sur cette plaque de base et sous l'action de TssA, débute la polymérisation de la queue contractile (3) formée de deux sous-unités majeures : la seringue interne (hexamère des protéines Hcp) et la gaine contractile externe (TssBC) (4). Après élongation, TssA et TagA interagissent à l'extrémité distale de la cellule bactérienne pour interrompre l'assemblage *de novo* de la queue contractile et ainsi stabiliser le complexe formé (5). ClpV est une ATPase AAA+ permettant le recyclage du système et le démontage de la machinerie moléculaire après un cycle d'assemblage / contraction de la gaine externe (6) (**Adapté de Cherrak et al., 2019**).

effecteurs et / ou protéines de l'immunité (Boyer *et al.*, 2009; Coulthurst, 2013; Silverman *et al.*, 2011). Plusieurs locus sur le génome d'une souche peuvent coder l'ensemble des gènes nécessaires à la mise en place d'un SST6, une situation largement rencontrée chez les entérobactéries (Boyer *et al.*, 2009; Journet and Cascales, 2016). Cependant, la fonction, la régulation et l'interdépendance de ces multiples clusters au sein d'une même souche bactérienne restent encore mal décrits. Enfin, en plus des gènes codant les composants du SST6 regroupés dans des opérons, d'autres gènes impliqués dans ce système de sécrétion dits orphelins peuvent être retrouvés disséminés dans d'autres régions du génome, comme c'est le cas notamment pour *hcp*, *vgrG* et *PAAR* (Journet and Cascales, 2016). Ces gènes pourraient aussi coder des toxines supplémentaires susceptibles d'être prises en charge par le SST6.

L'augmentation marquée du pourcentage en GC dans la majorité des opérons SST6 est en faveur d'une intégration récente de ce facteur de virulence *via* des phénomènes de transfert horizontal (Bingle *et al.*, 2008; Boyer *et al.*, 2009; Journet and Cascales, 2016). Bien que les core gènes soient très conservés, l'organisation des différents opérons du SST6 est fortement variable en fonction des espèces bactériennes, suggérant une acquisition différente du SST6 selon les espèces. Par exemple, les SST6 présents chez *Salmonella* sont très différents de par leur structure de ceux décrits chez *E. coli*, mais ils diffèrent également dans la nature des effecteurs alors que ces deux espèces sont proches phylogénétiquement (Journet and Cascales, 2016). Chez *K. pneumoniae*, la majorité des souches possède des gènes codant un SST6, regroupés en 1 à 4 îlots génomiques (d'une longueur supérieure à 24kb). Ces différents clusters présentent des blocs synténiques concernant les core gènes de la machinerie moléculaire, séparés par des régions d'insertion variables en fonction des souches. Les régions variables comprennent des gènes accessoires codant des protéines de fonctions inconnues ou des effecteurs toxiques (Barbosa and Lery, 2019; Li *et al.*, 2022; Sarris *et al.*, 2011; Storey *et al.*, 2020).

2. Organisation structurale et fonctionnelle

Le SST6 sous sa forme complète résulte de l'assemblage dynamique de plusieurs complexes structuraux dans un ordre bien défini et architecturalement normé (Cherrak *et al.*, 2019) (**Figure 30**) : i) le **complexe membranaire**, formé des protéines TssJLM, permet l'ancrage de la machinerie moléculaire dans l'espace périplasmique, ii) la **plaqué de base** ou

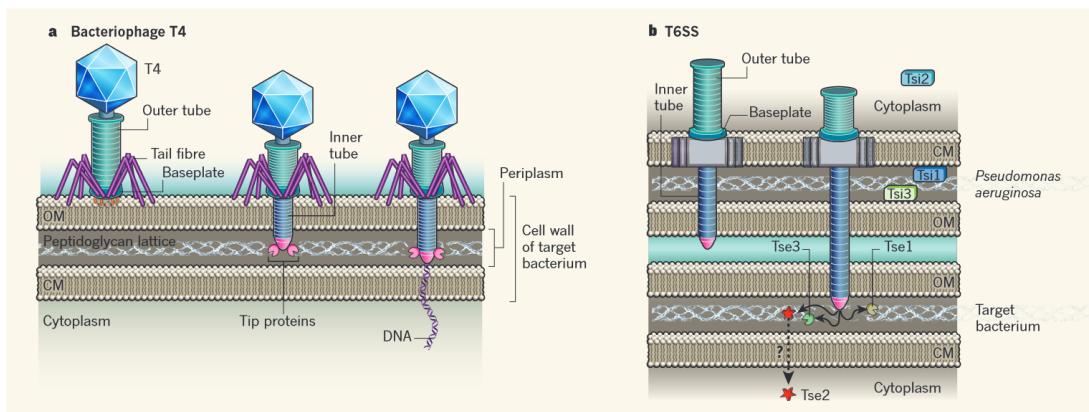


Figure 31. Homologie structurale entre le bactériophage T4 et le SST6. Les 13 protéines composant le SST6 partagent des homologies structurales avec celles retrouvées chez le phage T4 (représentées selon un même code couleur sur les 2 panels). A gauche, le bactériophage reconnaît la cellule cible et y adhère pour ensuite aller extraire son contenu en ADN via sa queue contractile. La présence de domaines dégradant le peptidoglycane sur les protéines « Tip » permet de former un pore dans la bactérie et faciliter la libération d'ADN. A droite, le SST6 fonctionne de manière similaire, avec une reconnaissance bactérie/bactérie qui initie la contraction de la queue contractile et la libération des effecteurs dans la cellule cible (ici Tse1, Tse2 et Tse3, qui sont des amidases actives contre le peptidoglycane (D'après Cotter et al., 2011).

plaqué basale, constituée par TssEFGK, permet la jonction entre le complexe membranaire et iii) la **queue contractile** composée d'une « seringue » interne (constituée d'hexamères des protéines Hcp) autour de laquelle viennent se recruter les différentes sous unités de la gaine contractile externe (constituée par TssBC). A l'extrémité de cette queue contractile, la pointe perforante est composée des protéines VgrG organisées en trimères, ainsi que des répétitions de protéines PAAR (Proline-Alanine-Alanine-Arginine). Enfin, la polymérisation et l'élongation de la queue contractile est coordonnée par la protéine TssA, en forme de chapeau à l'extrémité distale. A la fin de l'élongation, TssA interagit avec TagA pour stopper l'assemblage du fourreau contractile et maintenir le SST6 dans sa conformation étendue lorsque la partie distale rencontre la membrane opposée de la cellule. Après assemblage et contraction du SST6, l'ATPase cytoplasmique ClpV AAA+ (Caseinolytic peptidase V) est recrutée pour permettre le recyclage de la machinerie moléculaire et la réutilisation ultérieure du SST6.

La proximité à la fois structurale et fonctionnelle du SST6 avec le bactériophage T4 est également en faveur d'une acquisition par transfert horizontal. En effet, Leiman *et al.* ont montré que la queue contractile forme une structure similaire à la queue des phages (Leiman *et al.*, 2009). La protéine de gaine Hcp est homologue aux protéines du tube phagique (gp19) ; de même, VgrG partage une homologie structurale avec la tête perforante du phage composée des protéines gp5 et gp27 (Basler, 2015; Brunet *et al.*, 2014; Cascales and Cambillau, 2012; Coulthurst, 2013). Cependant, la gaine contractile externe formée par TssBC présente aussi une structure homologue aux queues contractiles des bactériophages, mais TssB et TssC ne partagent pas d'homologies de séquences avec la protéine de tube phagique gp18 (Cascales and Cambillau, 2012). Enfin, une étude de cryo-tomographie a permis la caractérisation d'un mécanisme d'action du SST6 également similaire à celui des phages, avec la visualisation du complexe sous ses formes à la fois relâchée et contractée (Basler *et al.*, 2012; Zoued *et al.*, 2014). Ainsi, de la même façon qu'un phage injecte son matériel génétique dans une cellule cible sous l'action contractile de la gaine externe, le SST6 secrète des effecteurs dans une cellule cible après contraction de la gaine contractile externe et la propulsion du tube interne à travers la membrane cytoplasmique (**Figure 31**).

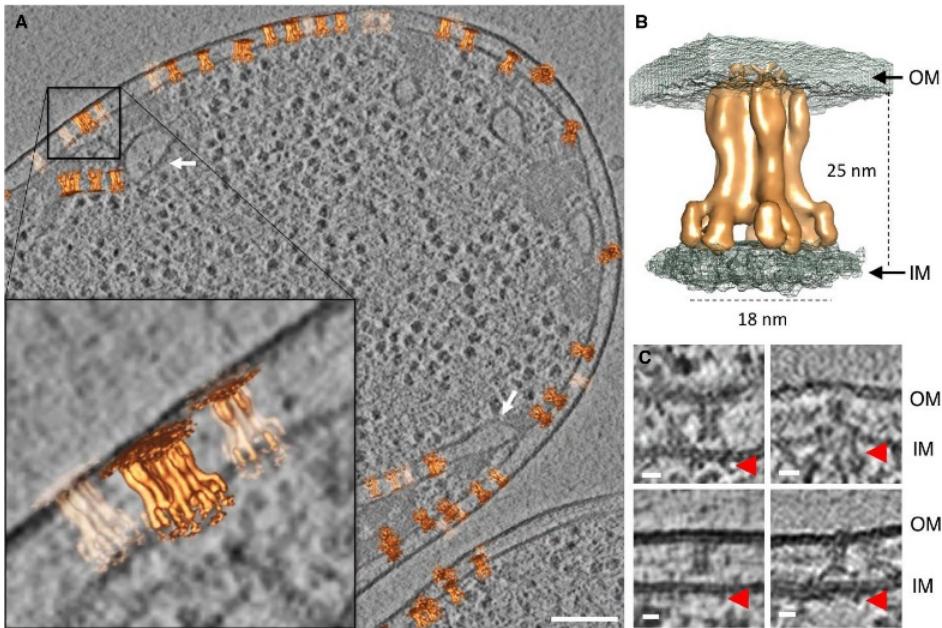


Figure 32. Visualisation de la structure du complexe membranaire par cryotomographie. (A) Vue du complexe membranaire par coupe en cryotomogramme. La zone grossie permet d'apprécier la répartition du complexe membranaire au sein de l'espace périplasmique. Les flèches blanches indiquent la présence de certaines parties du complexe TssJLM au sein d'invaginations de la membrane. (B) Dimensions du complexe membranaire et positionnement par rapport à la membrane interne (IM) et la membrane externe (OM). (C) Vue du complexe membranaire sur la largeur. Les flèches rouges représentent les extensions cytoplasmique du complexe membranaire (D'après Rapisarda *et al.*, 2019).

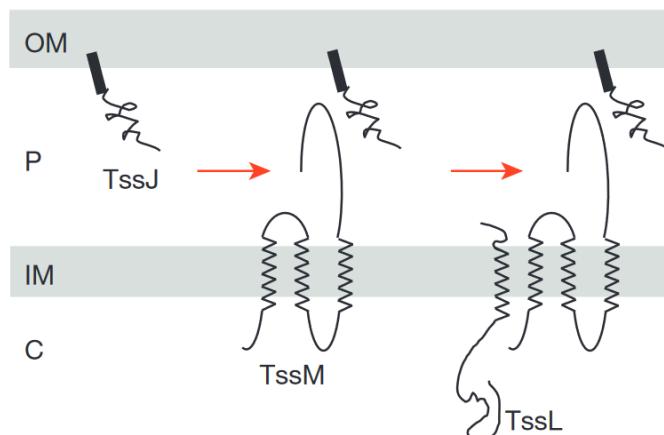


Figure 33. Assemblage du complexe membranaire. Le positionnement de la lipoprotéine TssJ et son ancrage au niveau de la membrane externe permet le recrutement successif des protéines de la membrane interne TssM et Tssl dans leur localisation finale. OM : Outer membrane, P : Periplasm, IM : Inner membrane; C : Cytoplasm (D'après Durand *et al.*, 2015).

2.1. Le complexe membranaire

La mise en place du SST6 débute par l'assemblage du **complexe membranaire (MC)** formé par TssJLM dans l'espace périplasmique de la bactérie. Chez *E. coli*, l'analyse de la structure du MC en microscopie cryo-EM a permis de définir un poids moléculaire de 1.7 MDa pour une résolution de 4.9Å, une hauteur de 25nm et une largeur de 18nm (**Figure 32**) (Rapisarda *et al.*, 2019; Durand *et al.*, 2015). Cette structure présente une symétrie axiale d'ordre 5 pour une stœchiométrie de 3 :2 :2 pour les différentes sous-unités TssJ, TssL et TssM (Rapisarda *et al.*, 2019). Ce complexe membranaire est constitué de 5 dimères du complexe hétérotrimérique TssJLM (Durand *et al.*, 2015). **TssJ** est une lipoprotéine associée à la membrane externe qui, en s'invaginant dans l'espace périplasmique, forme un repli similaire à la transthyrétine (Aschtgen *et al.*, 2008; Felisberto-Rodrigues *et al.*, 2011). **TssL** et **TssM** sont des composants ancrés à la membrane interne de la cellule (Logger *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2019). TssM possède une partie N-terminale cytoplasmique, trois hélices transmembranaires et un large domaine périplasmique permettant la mise en place du complexe transmembranaire (Felisberto-Rodrigues *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2019). TssL est ancrée à la membrane interne par un segment transmembranaire simple en C-terminal, essentiel à l'assemblage du complexe membranaire, et porte un domaine cytoplasmique comprenant deux hélices α (Aschtgen *et al.*, 2012; Logger *et al.*, 2016). De manière intéressante, TssM et TssL partagent des homologies de séquence, de localisation et de topologie avec les protéines structurales du SST4b, IcmF et IcmH respectivement, retrouvées chez *L. pneumophila* et *Coxiella burnetti*, suggérant une évolution parallèle de ces deux systèmes de sécrétions bactériens (Zoued *et al.*, 2014, 2016b). Chez certains genres bactériens (*Acinetobacter* et *Agrobacterium*), la protéine TssJ est manquante (Cherrak *et al.*, 2019; Weber *et al.*, 2013). A l'inverse de TssL et TssM, TssJ ne possède pas d'homologie avec d'autres protéines identifiées du SST4, ce qui suggère que l'acquisition du gène *tssJ* au sein des clusters du SST6 provient certainement d'un ancêtre différent.

L'assemblage du MC débute toujours par le positionnement de la lipoprotéine TssJ pour le recrutement ultérieur de TssM et TssL (Durand *et al.*, 2015) (**Figure 33**). Concernant les interactions entre ces différents composants, la lipoprotéine ancrée dans la membrane externe TssJ interagit avec le domaine C-terminal périplasmique de TssM. TssL et TssM

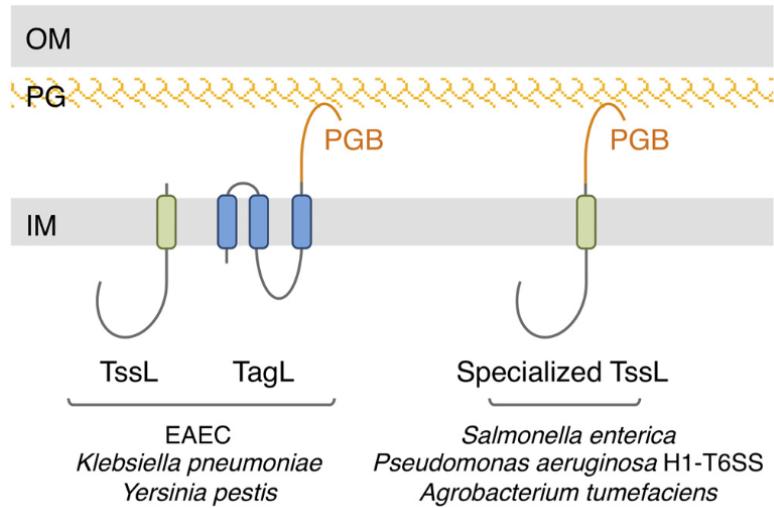


Figure 34. Ancrage du complexe membranaire au peptidoglycane. Chez les EAEC et d'autres espèces, le SST6 encode TssL et TagL, possédant une triple hélice transmembranaire (**bleu**) et un domaine périplasmique de liaison au peptidoglycane (**PGB**). Dans la majorité des cas, l'ancrage du complexe membranaire est permis grâce à TssL qui possède un domaine C-terminal de liaison au peptidoglycane (*S. enterica*, *P. aeruginosa*, *A. tumefaciens*). OM : Outer membrane, PG : Peptidoglycan, IM : Inner membrane (D'après Santin et al., 2019a).

interagissent entre elles *via* leurs segments transmembranaires respectifs (Cherrak *et al.*, 2019; Felisberto-Rodrigues *et al.*, 2011). Les domaines cytoplasmiques des protéines de membrane interne TssL et TssM interagissent également entre eux et permettent l'établissement d'un contact étroit avec les composants de la plaque de base recrutés ultérieurement (Brunet *et al.*, 2015b; Zoued *et al.*, 2016b). L'harmonie d'architecture de toute la structure du SST6 dépend de la stabilité du MC - notamment pendant la contraction de la gaine - assurée par un ancrage au peptidoglycane de la cellule bactérienne (Santin *et al.*, 2019a). Dans la plupart des SST6, cet ancrage est garanti par la partie C-terminale de TssL possédant des régions homologues à des domaines de liaison au peptidoglycane (OmpA/Pal/MotB) (Aschtgen *et al.*, 2010a, 2010b; Zoued *et al.*, 2014). Cependant, dans les clusters de SST6 où les sous-unités TssL ne possèdent pas de tels domaines, celles-ci codent une protéine supplémentaire, telles que TagL, TagN, TagP et TagW. **TagL** en particulier possède des structures homologues aux domaines de liaison cités ci-dessus, dont outer membrane protein A (OmpA) ou OmpA-like (le moteur de flagelle bactérien MotB ou encore la lipoprotéine associée au peptidoglycane Pal), qui permet l'ancrage du SST6 au peptidoglycane (Aschtgen *et al.*, 2010a, 2010b; Nguyen *et al.*, 2021; Santin *et al.*, 2019a) (**Figure 34**). Le peptidoglycane représente une barrière physique à l'assemblage de ces structures du fait de la largeur supérieure du MC (18nm environ) par rapport au diamètre des pores du peptidoglycane (2 nm environ) (Santin and Cascales, 2017). Chez une souche d'*E. coli* entéroagrégatif, la transglycosylase lytique MltE est capable de remodeler le peptidoglycane pour permettre l'assemblage et la mise en place du MC (Santin and Cascales, 2017).

2.2. La plaque de base

Une fois le MC mis en place, le recrutement des éléments composant **la plaque de base (BP)** peuvent s'y fixer. Cette BP est un complexe large de 2.7 MDa composée d'au moins 6 protéines différentes incluant **TssE**, **TssF**, **TssG**, **TssK**, **VgrG** et **TssA** (Brunet *et al.*, 2015b; Cherrak *et al.*, 2018). Le rôle de la BP est double : elle permet d'initier la polymérisation de la queue contractile du SST6 et sert de complexe stabilisateur entre le MC et la queue contractile. Ce dernier rôle est notamment permis grâce à l'organisation du complexe TssEFGK en forme de « cale » (le terme anglais « wedge » est utilisé dans la littérature) avec une stœchiométrie de 1:2:1:6. La partie centrale est composée des protéines TssFG qui forment

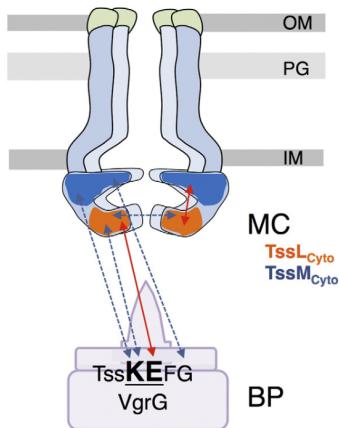


Figure 35. Interactions entre les composants du complexe membranaire et de la plaque de base.

Plusieurs interactions ont été montrées dans la littérature entre les composants du complexe membranaire (TssL et TssM) via leurs parties cytoplasmiques et les protéines de la plaque de base (TssK et TssE). OM : Outer membrane, PG : Peptidoglycan, IM : Inner membrane (**D'après Zoued et al., 2016**).

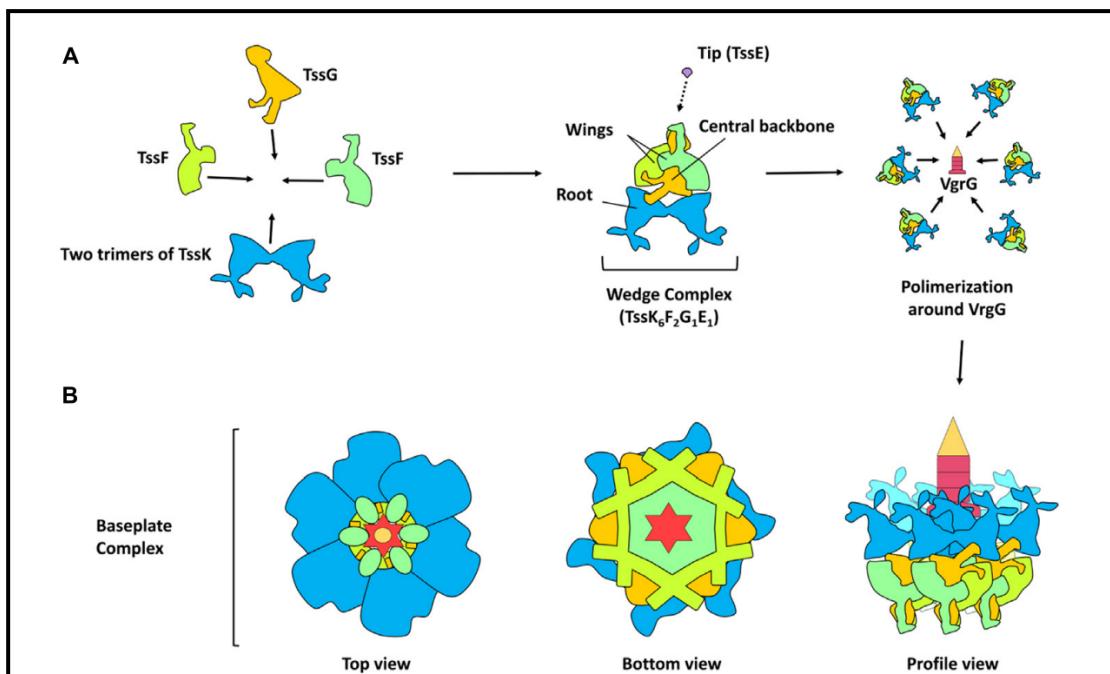


Figure 36. Modèle d'assemblage de la plaque de base. (A) La structure en forme de « cale » est organisée en 5 sous-unités TssKFGE d'une stochiométrie de 6 (deux trimères) :2 :1 :1 respectivement. Les deux sous-unités TssF s'assemblent en forme d'ailes (« wings ») autour du squelette central (« central backbone ») formé par TssG et TssE et de la racine (« root ») composée des deux trimères de TssK. La synthèse de la plaque de base est ensuite permise grâce au recrutement de six cales autour de VgrG. (B) Représentation schématique de la plaque de base dans sa conformation finale sous différents angles (De gauche à droite : vu de dessus, de dessous et de profil) (**Adapté de Navarro Garcia et al., 2019**).

un complexe trimérique (2 sous-unités TssF + 1 sous-unité TssG) en forme de triangle (Cherrak *et al.*, 2018).

L’assemblage de la BP nécessite plusieurs étapes. Zoued *et al.* proposent un modèle interactomique dans lequel un dodécamère de TssA se positionne sur le MC TssJLM pour recruter ensuite les composants de la BP et de la queue contractile (Zoued *et al.*, 2016a, 2016b). TssA pourrait également jouer un rôle de chaperonne afin d’assurer une meilleure stabilité du MC (Zoued *et al.*, 2016a, 2016b, 2017). TssA interagit ensuite avec les protéines TssE, VgrG et TssK pour notamment faire le lien avec le MC *via* des interactions avec TssF et TssG. Le complexe TssEFG permet l’ancrage au complexe membranaire *via* la partie cytoplasmique de TssL (Brunet *et al.*, 2015b; Zoued *et al.*, 2016b; Nguyen *et al.*, 2017). Plusieurs études ont identifié le rôle central de TssK dans la jonction avec TssFG (*via* sa partie N-terminale) et TssL et TssM du MC (*via* sa partie C-terminale) (Brunet *et al.*, 2015b; Nguyen *et al.*, 2017; Zoued *et al.*, 2013) (**Figure 35**). La structure TssEFGK est un polymère encerclant la protéine VgrG, bien que TssE ne semble pas essentielle à la formation du complexe TssFGK-VgrG. Plus récemment, Cherrak *et al.* ont proposé que la biosynthèse de la BP commence par la formation des trimères de TssFG, suivie de la complexation avec TssK pour former des unités TssFGK et ensuite le recrutement de TssE (avant ou après assemblage de ce complexe) pour *in fine* former une « cale » hexagonale TssEFGK (Cherrak *et al.*, 2018). Six cales sont assemblées de façon circulaire autour d’un trimère de VgrG pour former la BP dans sa conformation finale (Navarro-Garcia *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2018) (**Figure 36**).

2.3. La queue contractile

Comme chez les bactériophages, la BP du SST6 sert de support et de plateforme d’assemblage pour la polymérisation de la **queue contractile** qui regroupe à la fois la seringue interne (composée d’hexamères de **Hcp**) et la gaine contractile externe (composée des protéines **TssB** et **TssC**). Cette structure tubulaire présente une longueur d’environ 1 µm au niveau cytoplasmique et la durée de son assemblage varie de 30 à 50 secondes (Basler *et al.*, 2012; Brunet *et al.*, 2013). La seringue interne (diamètre externe = 9 nm et diamètre interne = 4 nm (Ballister *et al.*, 2008)) est donc composée d’anneaux eux-mêmes constitués par des hexamères de protéines Hcp, empilés les uns sur les autres selon une orientation « head-to-tail » et cette conformation est dépendante de la présence des autres protéines du core SST6

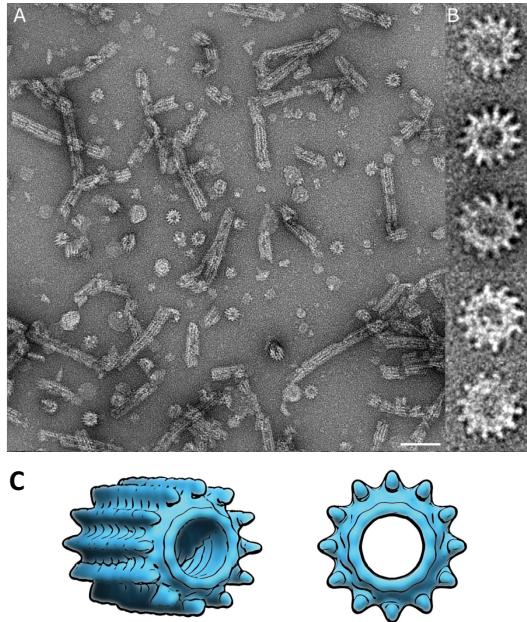


Figure 37. Structure tubulaire et « roue dentelée » TssBC vue en microscopie électronique. (A) La structure en forme de tube des gaines contractiles de TssBC ainsi que leur vue de dessus en « roue dentelée » est représentée ici. Barre d'échelle = 100 nm. **(B)** Exemple de structures en « roue dentelée » avec une lumière interne de 100Å. **(C)** Représentation schématique de la tubulure formée par TssB et TssC en symétrie axiale d'ordre 12 (**Adapté de Lossi et al., 2013**)

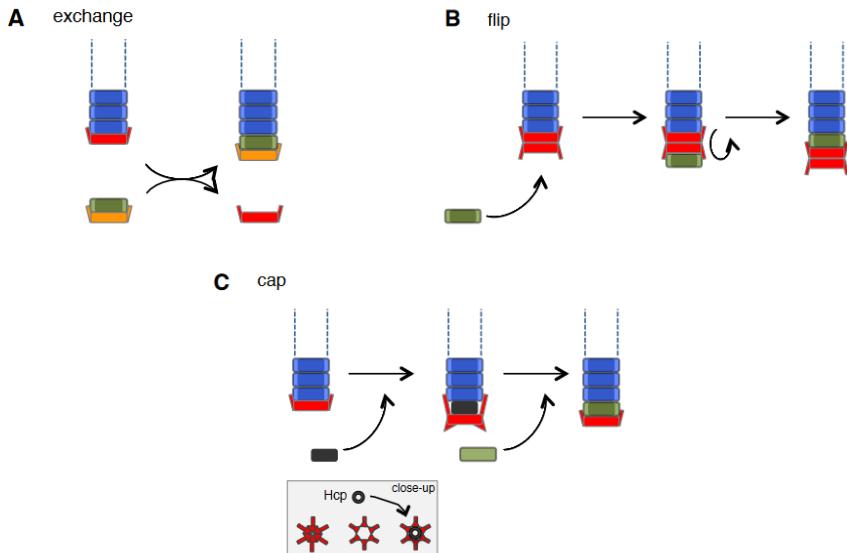


Figure 38. Représentation schématique des différents modèles de polymérisation de la queue contractile. (A) Dans le modèle « exchange », une nouvelle sous-unité TssA (rouge) est recrutée en même temps que le complexe Hcp-TssBC (vert), et échangée avec l'ancienne protéine TssA située à l'extrémité distale de la queue contractile. **(B)** Le modèle « flip » implique la symétrie axiale d'ordre 6 que présente le complexe TssA. Si deux protéines TssA présentent leur face interne à l'extérieur, un complexe Hcp-TssBC est recruté, puis l'ensemble réalise un « flip » pour l'intégration de TssBC et Hcp dans la queue contractile. **(C)** Le modèle « cap » reste le plus probable, avec des sous-unités Hcp recrutées après ouverture de TssA dans sa conformation large, pour ensuite se refermer et permettre le recrutement de TssBC par-dessus (**Adapté de Zoued et al., 2017**).

(Brunet *et al.*, 2014). VgrG se trouve à l'extrémité de cette seringue interne et constitue la pointe perforante (par analogie : l'aiguille de la seringue) requise pour l'assemblage des hexamères d'Hcp (Brunet *et al.*, 2014). Les deux composants Hcp et VgrG sont d'ailleurs largement utilisés en tant que marqueurs de l'activité du SST6 puisqu'ils sont sécrétés dans l'environnement extérieur (Ballister *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2017). VgrG contient de nombreux domaines conservés dont un domaine N-terminal (ressemblant à la protéine gp5-27 du bactériophage T4), un domaine oligosaccharide/oligonucleotide-binding ((OB)-fold), un domaine lysozyme facultatif (Uchida *et al.*, 2014) et un domaine C-terminal comprenant une triple hélice β variable en termes de nombre de feuillets β et de séquence en acides aminés (Leiman *et al.*, 2009; Uchida *et al.*, 2014). De plus, l'aiguille formée par VgrG est le plus souvent décorée d'un motif PAAR à son extrémité, *via* la liaison à la partie C-terminale de l'hélice β de VgrG (Shneider *et al.*, 2013). Les gènes *vgrG* et *PAAR* sont souvent situés côte à côte dans les clusters SST6, suggérant qu'ils sont génétiquement liés (Leiman *et al.*, 2009). Le motif PAAR a été montré comme essentiel à la bonne fonction du SST6 chez *V. cholerae* et *Acinetobacter baylyi* (Shneider *et al.*, 2013).

Le composant TssE de la BP est considéré comme initiateur dans la polymérisation de la gaine contractile externe, de façon similaire aux protéines gp25-like chez le bactériophage T4 (Taylor *et al.*, 2016). TssB et TssC s'associent sous forme de dimères stables (*via* l'hélice α du domaine C-terminal de TssB) et plusieurs dimères sont ensuite empilés pour former la gaine contractile (Bröms *et al.*, 2013; Cherrak *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). La structure finale, un motif de « roue dentelée » avec une symétrie axiale d'ordre 12 et un diamètre interne de 100Å, est assez large pour accueillir le seringue interne composée des hexamères de Hcp (85Å) (Lossi *et al.*, 2013) (**Figure 37**). Les assemblages de la seringue interne et de la gaine contractile externe sont interdépendants, les hexamères de Hcp servant de cadre pour l'assemblage de TssBC et la polymérisation de la gaine contractile externe (Brunet *et al.*, 2013).

2.4. Rôle pivot des protéines TssA et TssA-like

L'assemblage de la queue contractile du SST6 commence par le recrutement de TssA, à l'extrémité distale, qui coordonne la polymérisation en interagissant avec Hcp et TssC, grâce à sa structure en forme d'étoile de mer à 6 branches (Zoued *et al.*, 2016a). Trois différents

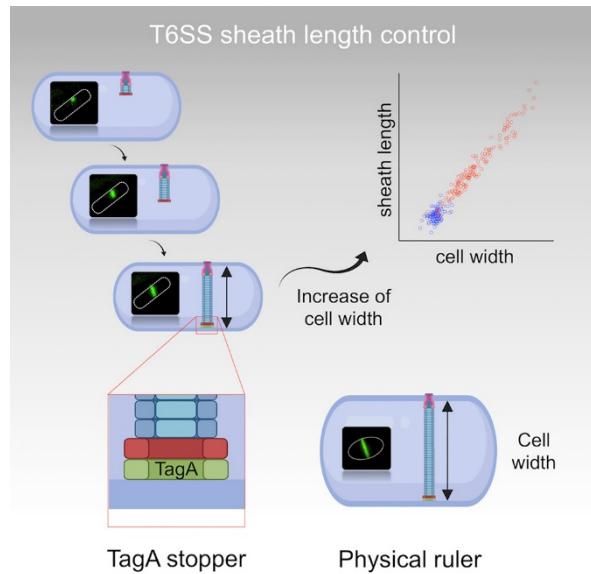


Figure 39. Arrêt de la polymérisation de la queue contractile en fonction du diamètre de la cellule : interaction TssA-TagA. La longueur de la queue contractile est constante au sein de la cellule bactérienne et est dictée par la largeur de la cellule. TagA est ancrée à la membrane opposée et interagit avec TssA (vert) pour stopper la polymérisation et l'assemblage des sous unités de la queue contractile (**D'après Santin et al., 2019b**).

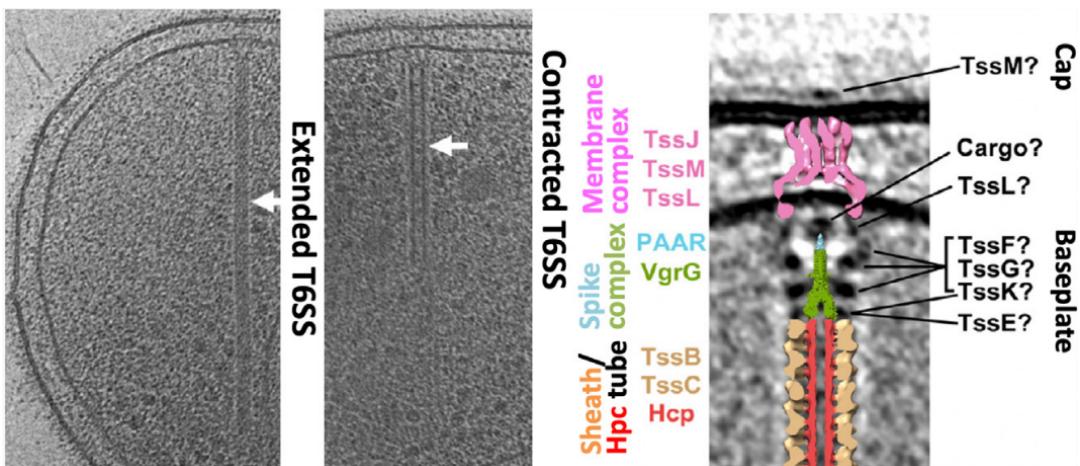


Figure 40. Visualisation en microscopie électronique du SST6 sous sa conformation étendue et contractée. La contraction de la gaine du SST6 entraîne une diminution de la longueur d'un ordre de 50% environ (Coupes tomographiques de cellules de *Myxococcus xanthus*). Les différentes sous-unités et protéines correspondantes sont représentées en couleur. L'identification est hypothétique dans le cas des composants accompagnés d'un « ? » (**Adapté de Navarro-Garcia et al., 2019**).

modèles d'assemblages de la queue contractile du SST6 sont proposés, tous coordonnés par TssA (Zoued *et al.*, 2017) (**Figure 38**). Le plus probable est le modèle « cap », où TssA s'élargit au niveau du triangle formé par son cœur central pour permettre le passage et incorporer des nouveaux hexamères d'Hcp. En parallèle, les bras de TssA recrutent, positionnent et stabilisent la formation de nouveaux dimères de TssBC. Ce modèle est notamment privilégié car il pourrait également permettre une stabilisation du complexe dans sa forme étendue (Zoued *et al.*, 2017). Les différents cycles d'assemblages se succèdent jusqu'à atteindre l'extrémité opposée de la cellule au niveau de la membrane. La largeur de la cellule dans laquelle est synthétisée le SST6 semble être le seul facteur limitant à la longueur du SST6. En effet, il a été montré que des sphéroplastes de *V. cholerae* conservaient leur capacité à synthétiser des SST6s fonctionnels d'un point de vue architectural et sécrétoire et que la longueur moyenne de la queue contractile était de 2.63µm de long contre 0.85µm pour la forme bacille normale (Vettiger *et al.*, 2017). En faveur de cette hypothèse, Santin *et al.* ont montré récemment que la longueur de la queue contractile du SST6 n'était pas déterminée par la disponibilité et la stoechiométrie des différentes sous-unités, ni par l'action d'une protéine régulatrice, mais par la distance à la membrane opposée au site d'initiation de la polymérisation du SST6 (Santin *et al.*, 2019b). De plus, la protéine accessoire, TagA est essentielle à l'arrêt de la polymérisation et à la stabilité du SST6 (**Figure 39**). TagA possède un domaine ImpA en C-terminal (Inner Membrane Protein A) ainsi qu'un domaine VasL facultatif de fonction inconnue (Schneider *et al.*, 2019). Ces deux domaines sont séparés par une région hydrophobe, qui permet l'ancrage de TagA à la périphérie de la membrane, à mi-chemin entre le pôle apical et le milieu de la cellule (Zoued *et al.*, 2017; Planamente *et al.*, 2016). TagA est capable d'interagir avec TssA, certainement par leurs domaines ImpA respectifs, et cette interaction permet une interruption de la synthèse de la queue contractile et la stabilisation du SST6 dans sa forme étendue (Santin *et al.*, 2018, 2019b; Zoued *et al.*, 2017). La similarité de séquence entre TssA et TagA a récemment amené les auteurs à classer TagA comme une protéine TssA-like (Schneider *et al.*, 2019). Malgré leur rôle prépondérant chez les EAEC et *V. cholerae*, ces protéines ne sont pas conservées au sein des clusters SST6, suggérant l'existence de différents mécanismes de contrôle pour l'assemblage de la queue contractile dans certaines espèces (Santin *et al.*, 2018, 2019b; Zoued *et al.*, 2017).

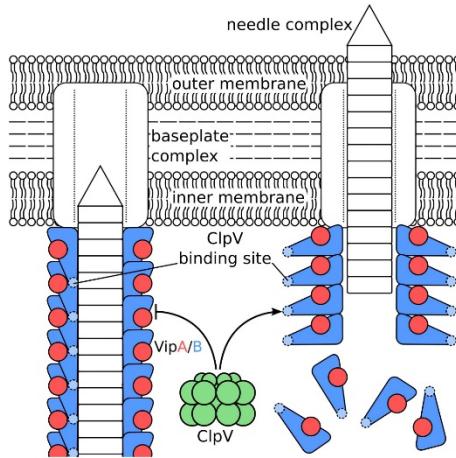


Figure 41. Action de l'ATPase AAA+ ClpV et désassemblage de la queue contractile. Sous sa forme étendue (gauche), les sous-unités TssB (VipA (rouge)) et TssC (VipB (bleu)) sont dans une certaine conformation et ClpV (vert) ne peut pas interagir avec le domaine N-terminal de TssC. Après contraction du SST6 (droite), les sous-unités TssBC changent de conformation permettant la reconnaissance de TssC par ClpV et l'initiation du désassemblage et du recyclage de la queue contractile (D'après Kube *et al.*, 2014).

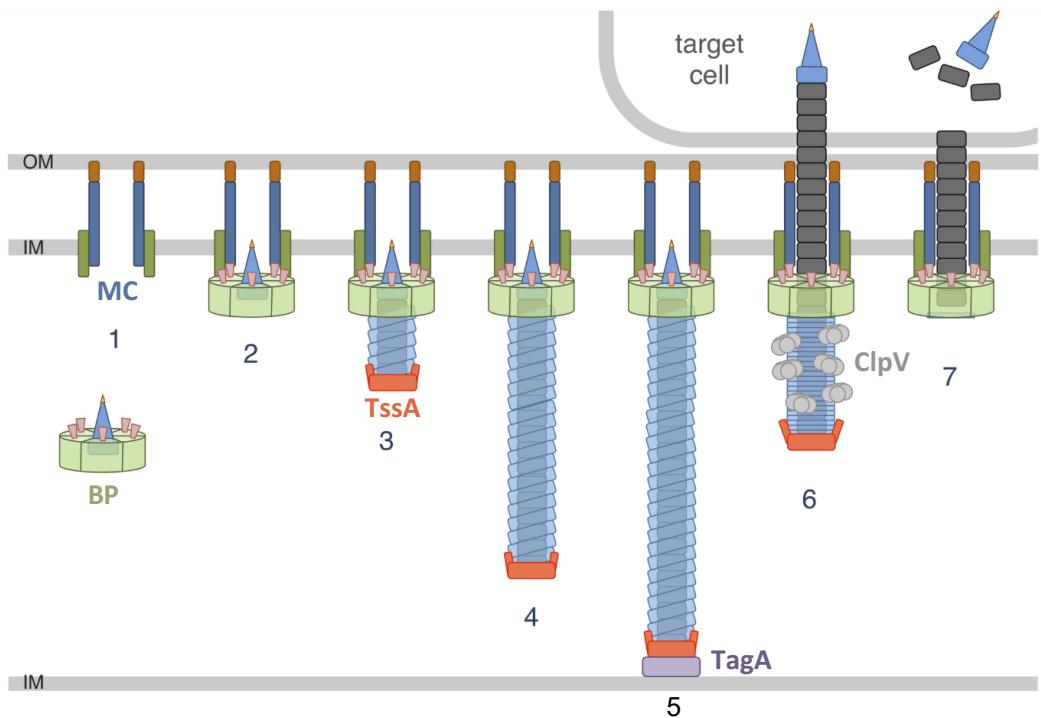


Figure 42. Représentation schématique de l'assemblage et de la mécanique de sécrétion du SST6. La biosynthèse du SST6 commence par le positionnement de TssJ et l'assemblage du complexe membranaire (MC), en parallèle de l'assemblage de la plaque de base (BP) (1). Le recrutement de la plaque de base sur le complexe membranaire par TssA (2) permet l'initiation de la polymérisation des sous-unités composant la queue contractile (3) et son élongation jusqu'à rencontrer TagA à l'extrémité opposée de la cellule (4 & 5). Après contraction et sécrétion des effecteurs dans la cellule cible (6), l'ATPase AAA+ ClpV recycle les différentes sous-unités de la queue contractile pour permettre la réutilisation ultérieure des sous-unités TssBC (7) (Adapté de Cherrak *et al.*, 2019).

2.5. Contraction et recyclage des sous unités : l'importance de ClpV

Après assemblage et maintien sous sa forme étendue, la gaine se contracte jusqu'à atteindre 50% de sa taille initiale, entraînant ainsi l'expulsion de la seringue interne et la libération des effecteurs toxiques (**Figure 40**). Cette contraction est très rapide (entre 2 et 5 ms chez *V. cholerae*) et est initiée au niveau de la BP par des signaux encore mal connus, mais cette action pourrait requérir un contact cellule-cellule (Vettiger *et al.*, 2017; Basler *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017). La contraction consiste en une réorganisation des sous-unités TssBC et notamment une rotation vers l'extérieur. En considérant une longueur de 1µm pour la queue contractile, le nombre de rotations moyennes nécessaires pour expulser le tube interne de 420nm est estimé à 4.2, ce qui correspond à une vitesse de 100µm.s⁻¹, en adéquation avec les paramètres de la contraction de la queue du phage T4 (Basler, 2015; Wang *et al.*, 2017). La quantité d'énergie libre émise pendant une simple contraction est proche de 44000 kcal.mol⁻¹ (Wang *et al.*, 2017). Quelques secondes après une contraction, la plaque de base est déstabilisée et se désolidarise de la queue contractile (Basler *et al.*, 2012; Brackmann *et al.*, 2018).

A la fin de la contraction, les sous-unités de la queue contractile sont recyclées par une ATPase hexamérique cytosolique, ClpV, membre de la famille Hsp100 des protéines AAA+ (Cascales and Cambillau, 2012). ClpV se lie à la partie N-terminale de TssC (accessible uniquement dans sa conformation contractée du SST6) et fournit l'énergie nécessaire à la dissociation des sous-unités TssBC (Kube *et al.*, 2014; Douzi *et al.*, 2016) (**Figure 41**). Les protéines de la queue contractile sont ensuite recyclées pour permettre leur réutilisation ultérieure (Kapitein *et al.*, 2013). De plus, ClpV permet également d'empêcher la formation spontanée de tubulures TssBC non productives (Kapitein *et al.*, 2013). Enfin, une autre ATPase similaire (ClpB) pourrait jouer un rôle semblable à ClpV chez d'autres espèces, dépourvues de gènes *clpV*, comme il a été démontré chez *Francisella tularensis* (Brodmann *et al.*, 2017).

Pour conclure, l'assemblage du SST6 est un processus complexe qui requiert une orchestration parfaite de la part de chacun de ses acteurs. Le cycle d'assemblage / contraction / recyclage complet est représenté et synthétisé en **figure 42**. L'assemblage correct de cette structure est nécessaire à son fonctionnement, et notamment à l'injection d'effecteurs toxiques dans des cellules cibles, qu'elles soient procaryotes ou eucaryotes.

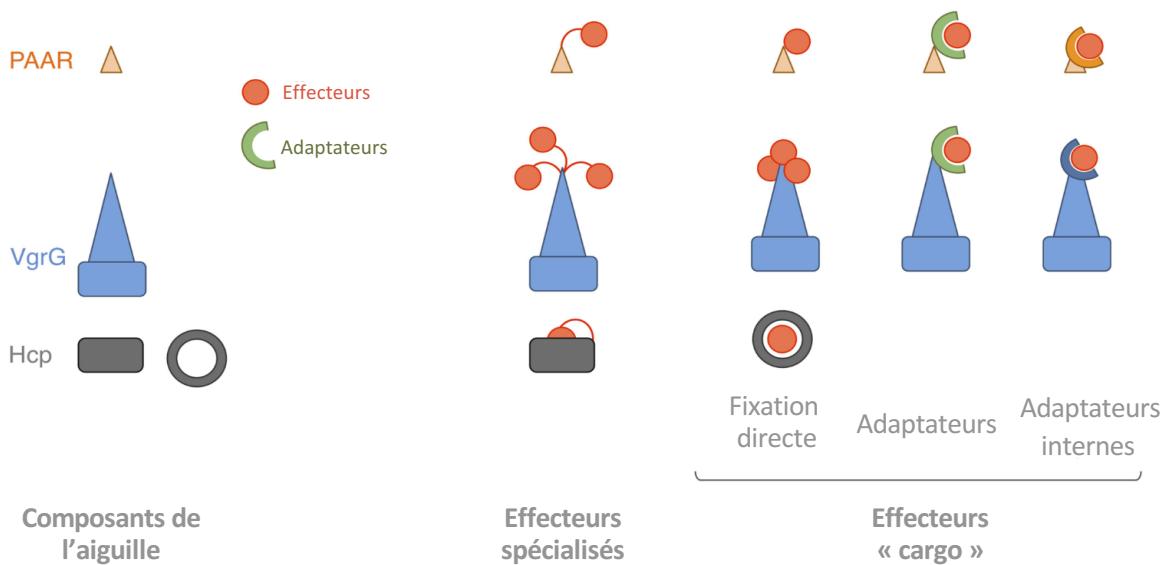


Figure 43. Représentation schématique du chargement des effecteurs du SST6. Dans le cas des effecteurs spécialisés, ceux-ci sont liés aux composants de l'aiguille par des extensions C-terminale de Hcp, VgrG ou PAAR. Les effecteurs « cargo » sont eux transcrits indépendamment et s'associent aux composants core de via fixation directe, ou encore de manière non-covalente par des modules adaptateurs indépendants (chaperonnes) ou liés à des extensions de VgrG et PAAR (adaptateurs internes) (Adapté de Cherrak *et al.*, 2019).

3. Rôles du SST6

Chez les bactéries pathogènes, l'utilisation du SST6 intervient à plusieurs étapes de l'infection. L'arsenal d'effecteurs délivré par le SST6 est très diversifié aussi bien d'un point de vue moléculaire que fonctionnel. En effet, ce système est impliqué dans l'export de toxines et leur injection dans des compétiteurs bactériens potentiels, mais aussi dans l'agression des cellules eucaryotes, *via* la sécrétion d'effecteurs protéiques spécifiques. En conséquence, les SST6s jouent un rôle sur la modulation des communautés bactériennes complexes (biofilms, microbiotes) mais aussi sur les organismes hôtes qui les hébergent.

3.1. Les effecteurs du SST6 : un véritable arsenal bactérien

Les effecteurs des SST6s sont associés aux composants de l'extrémité de la seringue Hcp-VgrG-PAAR (Coulthurst, 2019) mais leur prise en charge, leur mode et site d'action sont variables. Le classement des effecteurs en fonction de leur prise en charge permet de décrire deux types d'effecteurs. Les effecteurs produits et fusionnés aux core composants, sont transcrits et traduits en même temps que les core composants (souvent localisés en C-terminal du core composant) : on parle alors d'effecteurs spécialisés (Durand *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2017a; Shneider *et al.*, 2013; Unterweger *et al.*, 2017). Par opposition, les effecteurs dits « cargo » sont codés de manière indépendante, puis fixés directement ou recrutés par des adaptateurs, qui eux-mêmes peuvent être des domaines co-transcrits en même temps que les core composants (adaptateurs internes) ou indépendamment transcrits (chaperonnes) (Unterweger *et al.*, 2017) (**Figure 43**).

3.1.1. Effecteurs « spécialisés » ou « évolués »

Parmi les effecteurs spécialisés, les Hcp-ETs (Hcp with C-terminal Extension Toxins) ont été décrits chez plusieurs espèces appartenant aux *Enterobacteriaceae*. Ma *et al.* ont ainsi identifié une protéine Hcp comprenant un domaine toxique C-terminal HNH-DNase chez deux souches *E. coli* productrices de Shiga toxine (Shiga Toxin producing *E. coli* STEC) (Ma *et al.*, 2017a). De même, cinq Hcp-ETs ont été identifiés *in silico* chez plusieurs *Enterobacteriaceae* (Hcp-ET1 à -ET5), chacun portant des domaines toxiques C-terminaux différents (HNH-DNase, DUF2235 (Tle1 phospholipase), Pyocine S3 (DNase), Colicine-DNase, et Papaïne-like peptidase), ainsi qu'un domaine DUF796 nécessaire à leur sécrétion. L'identification de 350

Hcp-ETs dans dix-sept entérobactéries différentes, suggère un rôle prépondérant de ces effecteurs dans la pathogénicité (Ma *et al.*, 2017a).

De la même manière, certaines protéines PAAR comprennent en C-terminal des domaines avec des activités enzymatiques toxiques vis-à-vis des cellules procaryotes et eucaryotes et sécrétées *via* des liaisons avec la pointe des trimères de VgrG (Shneider *et al.*, 2013). *P. aeruginosa* produit une nucléase, Tse7 (type VI secretion exported 7) codée par le H1-SST6 qui comprend un domaine DUF4150 PAAR-like en position N-terminale (Pissaridou *et al.*, 2018). Ce domaine PAAR est essentiel à la délivrance de Tse7 médiée par le SST6 et permet de réaliser la jonction entre la toxine Tse7 et VgrG1b. Toujours chez *P. aeruginosa*, un autre effecteur codé par le H1-SST6, Tse6, a été décrit ; il s'agit d'un effecteur toxique transmembranaire, actif quand il est injecté dans le cytoplasme des cellules cibles *via* le SST6, et cette toxine contient aussi un domaine de liaison PAAR permettant la liaison à VgrG (Whitney *et al.*, 2014, 2015). Le rôle de ces effecteurs spécialisés PAAR est vraisemblablement multiple : une analyse bio-informatique a récemment mis en évidence plus de 1300 toxines liées à PAAR, réparties en 8 types et 16 sous-types (Zhang *et al.*, 2021).

Enfin, il existe également des VgrG spécialisés, bien décrits dans la littérature. Chez *V. cholerae*, VgrG1 possède un domaine C-terminal de liaison à l'actine et est transloqué dans les macrophages par le SST6 (Pukatzki *et al.*, 2007). De même, cette espèce bactérienne produit également une toxine VgrG3 avec un domaine peptidoglycane hydrolase, responsable de la lyse du peptidoglycane et donc d'une activité toxique lorsque celle-ci est injectée dans le périplasme d'*E. coli* en système hétérologue (Brooks *et al.*, 2013). Chez *Burkholderia pseudomallei*, VgrG5 est impliquée dans la fusion membranaire entre deux cellule hôtes, ce qui facilite son internalisation et sa réPLICATION intracellulaire (Toesca *et al.*, 2014). Chez *K. pneumoniae*, Li *et al.* ont également identifié *in silico* plusieurs domaines potentiellement toxiques en position C-terminale des protéines VgrG et PAAR (domaine lipase, alpha/beta hydrolase, toxine 44 et DNase), mais aucun effet de ces effecteurs spécialisés n'a été montré *in vitro* ou *in vivo* (Li *et al.*, 2022).

3.1.2. Effecteurs « cargo » et association aux protéines adaptatrices / chaperonnes / motifs de recrutement

Le transport des effecteurs « cargo » nécessite une reconnaissance entre ces protéines et des motifs de VgrG, Hcp et/ou PAAR (**Figure 43**). Elle peut être soit directe -*via* une liaison à Hcp - ou indirecte, *i.e.* médiée par des chaperonnes ou des domaines de recrutement Rhs (Recombination Hot Spots) fusionnés aux core composants ou transcrits indépendamment (Ma *et al.*, 2017a; Shneider *et al.*, 2013; Silverman *et al.*, 2013; Unterweger *et al.*, 2017).

Les protéines adaptatrices (ou chaperonnes) sont des protéines transcrrites et traduites indépendamment mais non sécrétées, qui permettent la fixation des effecteurs sur les composants Hcp, VgrG et PAAR (Bondage *et al.*, 2016; Unterweger *et al.*, 2015). Différentes familles de chaperonnes ont été décrites. La famille EagR/EagT (Eag : Effector associated gene) inclut des protéines possédant un domaine DUF1795 DcrB. Elle permet l'interaction entre VgrG et les effecteurs spécialisés porteurs d'un domaine PAAR-like en position N-terminale (Cianfanelli *et al.*, 2016; Whitney *et al.*, 2015). Les protéines Eag permettent la stabilisation des régions transmembranaires, ce qui assure le recrutement des effecteurs au niveau de VgrG et leur adressage dans la cellule cible (Coulthurst, 2019). Les chaperonnes de la famille Tec/Tap (contenant un motif DUF4123) permettent l'interaction et le chargement des effecteurs sur les sous-unités VgrG et PAAR. Ces chaperonnes possèdent un domaine C-terminal qui interagit spécifiquement avec le domaine N-terminal des effecteurs (Burkinshaw *et al.*, 2018; Liang *et al.*, 2015; Unterweger *et al.*, 2017).

Si les chaperonnes sont des unités transcriptionnelles et des protéines à part entière, les **domaines de recrutement ou motifs spécifiques** décorent les core composants VgrG et PAAR (adaptateurs internes). Les domaines TTR (Transthyrétine-like) sont retrouvés sous la forme d'extensions C-terminales des protéines VgrG et PAAR et permettent la liaison aux effecteurs. Chez *P. aeruginosa*, deux domaines TTR ont été identifiés pour VgrG4b et VgrG5 ; ils permettent la reconnaissance et la délivrance des effecteurs PldA et PldB de type phospholipase (Wettstadt *et al.*, 2019). Dans les souches d'*E. coli* entéroaggrégatifs (EAEC), le domaine TTR de VgrG^{EAEC} interagit avec le domaine N-terminal de Tle1, une autre phospholipase (Flaughnati *et al.*, 2020). De plus, les domaines TTR garantissent la stabilité des effecteurs et possèdent la capacité de les neutraliser (Flaughnati *et al.*, 2020; Wettstadt *et al.*, 2019). De façon identique, les domaines DUF2345 constituent des extensions C-terminales de

VgrG avec des fonctions additionnelles à la fonction des domaines TTR-like. En effet, chez *A. baumanii* et *K. pneumoniae*, ce domaine de VgrG a été montré comme étant essentiel à l’assemblage et au bon fonctionnement du SST6 (Lopez *et al.*, 2020; Storey *et al.*, 2020). Enfin, les gènes codant les protéines Rhs sont retrouvés au sein des clusters SST6s et ces protéines Rhs possèdent un motif de liaison PAAR en N-terminal et un domaine toxique en position C-terminale (Ma *et al.*, 2017b; Zhang *et al.*, 2021). Ma *et al.*, ont identifié plus de 400 protéines Rhs similaires chez *E. coli* (Rhs-CT possédant un domaine C-terminal doté d’un pouvoir toxique) et ont proposé une classification des différentes protéines Rhs-CT1 à -CT10, où la nature de l’effecteur et celle de l’activité enzymatique diffèrent en fonction de la nature de leur domaine C-terminal (metallopeptidase, DNase, RNase, deaminase, pore-forming) (Ma *et al.*, 2017b).

Une association préférentielle existerait entre la nature des effecteurs et celle du core composant qui sert de support. C’est le cas des phospholipases, qui semblent majoritairement associées avec VgrG (Russell *et al.*, 2013). A contrario, les effecteurs délivrés au niveau cytoplasmique (amidases, DNases) semblent être portés par les sous-unités PAAR et Hcp (Jurénas and Journet, 2021). D’autres domaines ont été identifiés récemment comme portant une fonction chaperonne : DUF2169 pour les effecteurs PAAR « évolués » chez *A. tumefaciens* ou encore le domaine DUF2875 avec une fonction d’adaptateur pour la phospholipase Tle3 chez *P. aeruginosa*. Cependant, les interactions entre les chaperonnes et les effecteurs sont encore mal connues (Manera *et al.*, 2022).

3.1.3. Les protéines de l’immunité : un antidote contre l’auto-intoxication

Les effecteurs étant spécifiquement toxiques pour les cellules du « non-soi », les cellules du « soi » possèdent des moyens de défense contre ces toxines et ce système de prévention vaut également pour les cellules « sœurs » voisines. C’est le rôle des protéines d’immunité ou « antitoxines ». Affiliées à leurs toxines respectives, ces antitoxines sont codées généralement par des gènes inclus au sein des clusters SST6, à proximité des gènes codant les effecteurs. Cependant, certains gènes codant des protéines d’immunité ont été retrouvés en absence de gène codant un effecteur ; ils ont vraisemblablement été acquis *via* des phénomènes de duplication ou de transferts horizontaux (Hersch *et al.*, 2020). Certains sont groupés en clusters et situés dans des zones du génome favorisant les transferts horizontaux (ICEs :

integrative conjugative elements) (Kirchberger *et al.*, 2017). La production des protéines d'immunité peut être soit constitutive, soit induite par le contact et l'attaque d'un compétiteur SST6 positif (Hersch *et al.*, 2020; Ross *et al.*, 2019), et ce phénotype constitue un avantage sélectif aux bactéries vis-à-vis des attaques médiées par le SST6.

Les protéines d'immunité sont situées dans le même compartiment cellulaire que le site d'action de la toxine et se fixent à la toxine *via* des interactions de haute affinité et spécificité et neutralisent l'activité des toxines *via* des interactions directes : soit en bloquant leur site actif, soit en empêchant la toxine d'accéder à sa cible (Alcoforado Diniz *et al.*, 2015; Coulthurst, 2019; Flaughnatti *et al.*, 2016). Certaines bactéries peuvent résister constitutivement aux effecteurs du SST6 en raison de l'absence de cibles du ou des effecteurs ou par la mise en place de réponses de défense (production d'exopolysaccharides, de ROS, formation de microcolonies...) (Hersch *et al.*, 2020). Flaughnatti *et al.* ont ainsi démontré la capacité d'*Enterobacter cloacae* et de *K. pneumoniae* à résister aux attaques du SST6 de *V. cholerae* respectivement par l'action d'un SST6 plus développé que la bactérie attaquante et la production d'une capsule de groupe I (Flaughnatti *et al.*, 2021).

Du fait de la complexité de classification des effecteurs et de leur capacité à cibler plusieurs types cellulaires, la nature des effecteurs est détaillée dans le chapitre suivant en fonction de leur activité et en décrivant plus spécifiquement les effecteurs décrits chez *K. pneumoniae*.

3.2. Toxicité du SST6 vis-à-vis des cellules eucaryotes

L'impact des SST6s sur les cellules eucaryotes a été initialement décrit en 2006 chez *V. cholerae* comme un mécanisme de défense vis-à-vis de l'amibe prédatrice *Dictyostelium discoideum* (Pukatzki *et al.*, 2006). L'injection de l'effecteur VasX *via* le SST6 provoque la formation de pores dans la double couche phospholipidique de l'amibe et entraîne sa lyse (Dong *et al.*, 2013; Miyata *et al.*, 2011). Un mécanisme analogue visant d'autres cellules eucaryotes a été depuis décrit chez d'autres bactéries comme *P. syringae*, *B. cenocepacia* ou encore *S. Typhimurium* (Gallegos-Monterrosa and Coulthurst, 2021).

Les interactions de *K. pneumoniae* *via* le SST6 avec les cellules eucaryotes sont étudiées dans divers modèles murins et autres. Par exemple, le rôle toxique du SST6 chez *K. pneumoniae* a été mis en évidence lors d'interactions avec la larve de papillon *Galleria*

mellonella, *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* (Storey *et al.*, 2020). Les mécanismes d’actions impliqués sont pour le moment peu décrits mais les SST6 induisent chez la cellule hôte un réarrangement du cytosquelette d’actine pouvant conduire à une modulation de la réponse cellulaire, notamment inflammatoire.

3.2.1. Perturbation du cytosquelette d’actine

Certains effecteurs du SST6 agissent au niveau cellulaire en générant des réarrangements du cytosquelette d’actine. C’est le cas de l’effecteur VgrG1^{AH} retrouvé chez *Aeromonas hydrophila* qui possède une activité ADP-ribosylase capable d’inhiber le processus de polymérisation du cytosquelette d’actine (Suarez *et al.*, 2010). VgrG1^{VC} de *V. cholerae* est impliqué dans la virulence au niveau intestinal. Cet effecteur possède un domaine C-terminal de liaison à l’actine (ACD), et est injecté dans les cellules, après endocytose de *V. cholerae* (Dutta *et al.*, 2019; Ma and Mekalanos, 2010), conduisant à une accumulation d’oligomères d’actines toxiques au sein des cellules épithéliales intestinales (Ma *et al.*, 2009; Ma and Mekalanos, 2010; Pukatzki *et al.*, 2007). De même, *Burkholderia cenocepacia* sécrète via son SST6 un effecteur, TecA, capable d’inactiver les GTPases RhoA et Rac1, détruisant ainsi le cytosquelette d’actine dans les macrophages (Aubert *et al.*, 2016). TecA participe également à la virulence de *B. cenocepacia*; il a été montré dans un modèle murin qu’il induit une inflammation pulmonaire marquée et une importante perte de poids lors d’une infection pulmonaire (Loeven *et al.*, 2021). La protéine VgrG4-CTD du SST6 de *K. pneumoniae* Kp 52.145 est capable de lier les filaments d’actine au sein des macrophages, altérant ainsi le remodelage des réseaux d’actine des cellules infectées (do Nascimento Soares *et al.*, 2022). *K. pneumoniae* produit également une phospholipase de type Tle5, Pld1, qui est impliquée dans la virulence de *K. pneumoniae* en modèle d’infection pulmonaire chez la souris, mais les mécanismes contribuant aux effets sur les cellules hôtes ne sont pas mis en évidence (Lery *et al.*, 2014).

L’action des effecteurs des SST6 ne se traduit pas nécessairement par une toxicité cellulaire mais elle peut jouer un rôle lors des phénomènes d’adhésion et/ou invasion. Comme cité précédemment, l’effecteur VgrG5 du SST6 de *Burkholderia* contient un domaine C-terminal impliqué dans la fusion membranaire de deux cellules, entraînant la formation de cellules géantes multinucléées, permettant aux bactéries intracellulaires de favoriser leur propagation, et contribuant à la virulence de cette bactérie en modèle murin (Schwarz *et al.*,

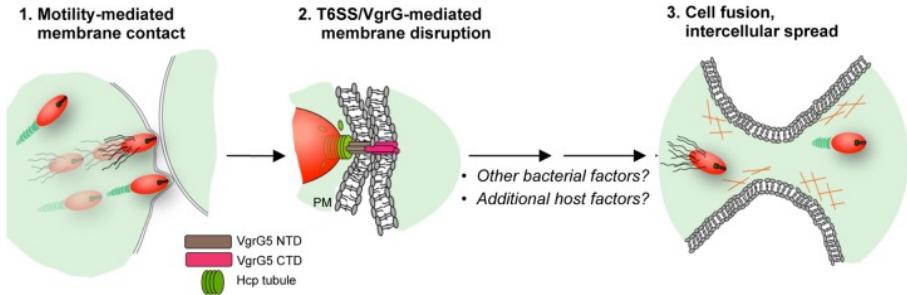


Figure 44. *B. pseudomallei* facilite son internalisation grâce à VgrG5 de manière SST6 dépendante. La capacité de motilité médierée par les flagelles de *B. pseudomallei* permet de faciliter le contact entre la bactérie et la membrane plasmique, ce qui permet d'établir un contact cellule-cellule (1). Après contact, la bactérie utilise son SST6-5 pour permettre l'injection de VgrG5 dans la jonction entre les 2 membranes de la cellule infectée et cellule cible, induisant une zone de forte perturbation de la bicouche lipidique membranaire (2), ce qui, à terme, induit la fusion des 2 cellules et facilite la dissémination intercellulaire (3) (Adapté de Toesca *et al.*, 2014).

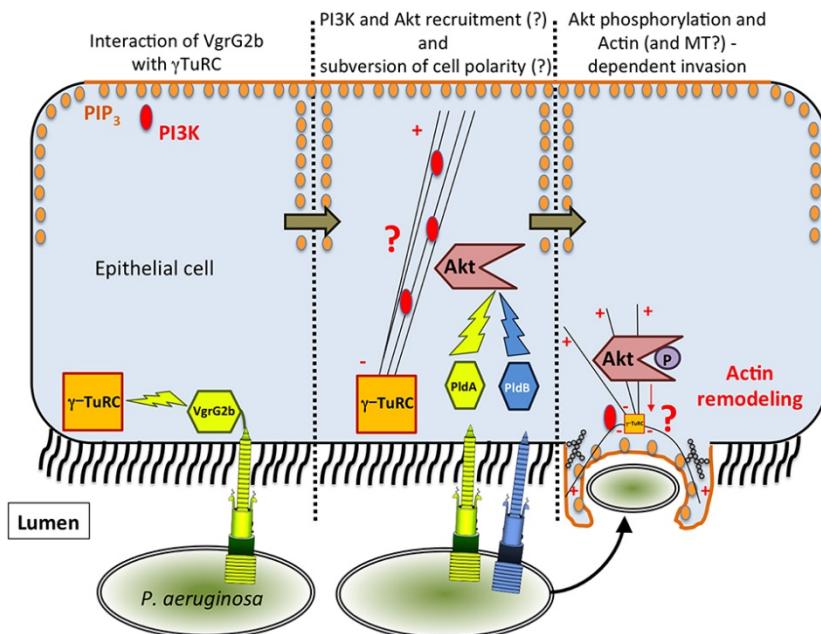


Figure 45. VgrG2b, PldA et PldB sont interdépendants et jouent un rôle complémentaire dans l'internalisation de *P. aeruginosa*. VgrG2b va interagir avec les microtubules γ -TuRC, provoquant en parallèle un changement de polarité de la cellule. Ce changement de polarité induit une nucléation des microtubules, activant la voie Pi3K et provoquant son recrutement à la membrane apicale. Enfin, PldA et PldB se lient à Akt, entraînant le remodelage de l'actine et facilitant l'internalisation de la bactérie (D'après Sana *et al.*, 2016).

2014; Toesca *et al.*, 2014) (**Figure 44**). L'internalisation de *P. aeruginosa* repose sur l'interaction complexe et complémentaire des 3 effecteurs VgrG2b, PldA et PldB (Sana *et al.*, 2016a) (**Figure 45**). PldA et PldB sont des phospholipases de type Tle5 (activité phospholipase D) transportées respectivement par le H2- et le H3-SST6 (Jiang *et al.*, 2014; Russell *et al.*, 2013). Bien qu'elles ne partagent aucune homologie entre elles, PldA et PldB sont toutes deux injectées dans le cytoplasme des cellules cibles épithéliales et se lient aux kinases Akt1 et Akt2, activant la voie PI3k-Akt - une voie de signalisation cellulaire essentielle, impliquée dans la croissance, la multiplication et les phénomènes de mort cellulaire (Kierbel *et al.*, 2005) - par phosphorylation de Akt (Jiang *et al.*, 2014). Cette activation permet un remodelage de l'actine et une formation de protrusions au niveau apical de la cellule hôte, favorisant ainsi l'internalisation de *P. aeruginosa* (Bleves *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2014) (**Figure 46**). De plus, VgrG2b, codée et sécrétée par le H2-SST6 de *P. aeruginosa*, contient un domaine C-terminal capable d'interagir avec les microtubules de nucléation γ-TuRC (γ-tubulin ring complex), ce qui contribue également à l'internalisation de la bactérie (Sana *et al.*, 2015; Wood *et al.*, 2019).

3.2.2. Activation de la réponse inflammatoire

Le point commun entre tous les effecteurs impliqués dans le remodelage de l'actine est leur capacité à induire une augmentation de la réponse inflammatoire, *via* notamment l'activation de différents inflammasomes. Chez *B. cenocepacia*, l'activation de inflammasome pyrine par le SST6 entraîne la libération de cytokines pro inflammatoire de type IL-1 β (Aubert *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2014). Chez *A. hydrophila*, l'effecteur VgrG1, déclenche l'apoptose des cellules ciblées médiée par l'activation de la caspase 9 (Suarez *et al.*, 2010). L'effecteur EvpP d'*E. tarda* est capable d'empêcher l'activation et l'oligomérisation de l'inflammasome NLRP3, par inhibition de la voie MAPK-Jnk (Chen *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2009). Chez *Francisella tularensis*, PdpC et PdpD sont deux effecteurs sécrétés par le SST6, ils sont impliqués dans la virulence et l'échappement phagolysosomal en activant l'inflammasome AIM2 (Eshraghi *et al.*, 2016; Brodmann *et al.*, 2017). Enfin, ZmpA et ZmpB, deux métalloprotéases produites par *B. cenocepacia*, sont également impliquées dans l'activation de la caspase-1 et la libération d'IL-1 β à la suite de l'infection cellulaire (Kooi and Sokol, 2009; Rosales-Reyes *et al.*, 2012). Ces derniers effecteurs sont multifonctionnels : en plus d'induire une réponse inflammatoire, ils permettent la lyse de la vacuole dans laquelle ils sont produits et se retrouvent ainsi dans le

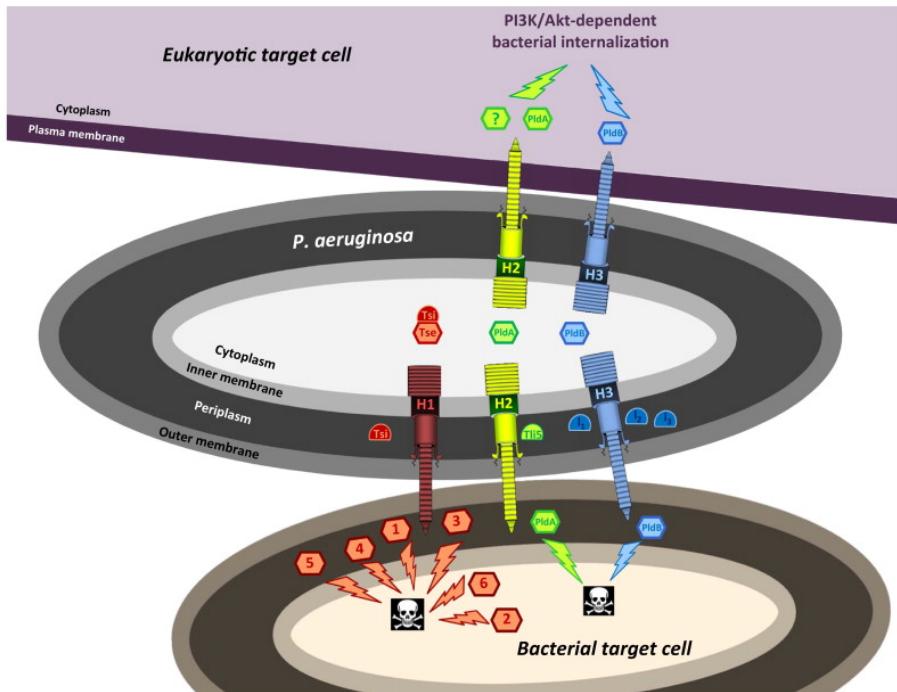


Figure 46. Effecteurs sécrétés par le SST6 H1, H2 et H3 chez *P. aeruginosa*. Si le H1-SST6 de *P. aeruginosa* délivre des effecteurs Tse1-6 impactant les procaryotes (bactéries) (orange), les H2- et H3-SST6 délivrent les effecteurs « transkingdoms » PldA (vert) et PldB (bleu) respectivement, agissant à la fois contre les procaryotes et les eucaryotes. PldA et PldB activent la voie Pi3k-Akt permettant de faciliter l'internalisation de *P. aeruginosa*. Les protéines d'immunités respectives de chaque toxine sont représentées avec un fond foncé dans leur compartiment respectif de liaison à la toxine (périplasme ou cytoplasme) (D'après Bleves et al., 2014).

cytoplasme où ils peuvent cliver des peptides antimicrobiens produits par l'hôte (Kooi and Sokol, 2009; Rosales-Reyes *et al.*, 2012).

3.3. Activité antibactérienne

La compétition inter-bactérienne médiée par le SST6 est largement décrite dans la littérature, que ce soit par des phénomènes de lyse cellulaire ou d'inhibition de croissance. Les premiers effecteurs associés à la machinerie moléculaire du SST6 et possédant une activité antibactérienne furent les Tse1-3 (Type VI exported 1-3) produits par *P. aeruginosa* (Hood *et al.*, 2010). Russell *et al.* ont ensuite caractérisé l'activité bactériolytique de cette famille d'effecteurs en lien avec la dégradation du peptidoglycane (Russell *et al.*, 2011). D'autres effecteurs décrits depuis agissent en perturbant l'intégrité de la cellule réceptrice (en déstructurant les structures membranaires ou périplasmiques) ou en ciblant des molécules cytoplasmiques notamment l'ADN (Alcoforado Diniz *et al.*, 2015; Durand *et al.*, 2014; Lien and Lai, 2017).

3.3.1. Effecteurs ciblant la paroi : hydrolyse du peptidoglycane

L'hydrolyse du peptidoglycane par des effecteurs délivrés par le SST6 correspond à des activités enzymatiques variées :

- les **amidases ou peptidases** Tae (Type VI amidase effector) hydrolysent les tétrapeptides du peptidoglycane et leurs liaisons latérales peptidiques (Ma *et al.*, 2018; Russell *et al.*, 2012). Les amidases Tae sont réparties en 4 familles (Tae1 à Tae4) qui diffèrent de par leur spécificité de clivage : Tae1 et Tae4 clivent les liaisons D-Glu-mDAP au sein d'un même peptide, tandis que Tae2 et Tae3 clivent les liaisons mDAP-D-Ala entre deux tétrapeptides (Durand *et al.*, 2014; Russell *et al.*, 2012) (**Figure 47**).

- les **peptidoglycane hydrolases** Tge (Type VI glycoside hydrolase effector) coupent les liaisons entre les résidus acide N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) et acide N-acétyl-muramique (MurNAc). Elles sont également classées en 3 sous familles (Tge1-3) (Hernandez *et al.*, 2020). Tous ces effecteurs sont neutralisés par leur protéine d'immunité spécifique (Tai pour Tae, Tgi pour Tge). D'autres amidases ont été identifiées chez *Acinetobacter* (TagX) et chez les souches d'*E. coli* entérotoxinogènes (ETEC) (VT1). Ces effecteurs hydrolysent le peptidoglycane d'une façon différente de celle des Tae1-4 : VT1 coupe les liaisons MurNAc-L-Ala du peptidoglycane

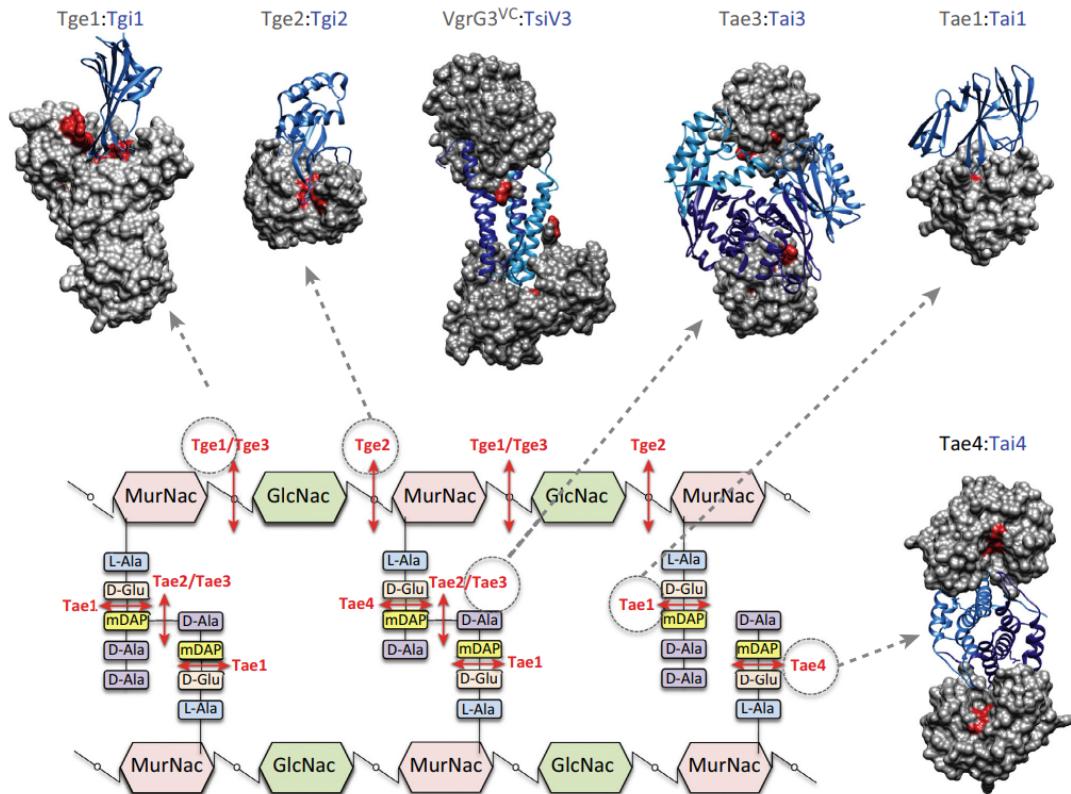


Figure 47. Représentation schématique du peptidoglycane et activité enzymatique des amidases (Tae) et peptidoglycane hydrolases (Tge). Les sites de clivage pour les amidases (Tae1-4) et les hydrolases (Tge1-4) sont représentés par des flèches rouges. Les amidases Tae1 et Tae4 hydrolysent les liaisons D-Glu-mDAP de la chaîne peptidique, tandis que Tae2 et Tae3 clivent les jonctions D-Ala-mDAP. Les hydrolases Tge coupent les liaisons entre les jonctions MurNac (NAM) et GlcNAc (NAG). Chaque couple toxine (noire) /antitoxine (bleue) est représenté sous sa forme cristallographiée en haut et à droite de l'image (D'après Durand *et al.*, 2014).

et TagX hydrolyse les liaisons L-Ala-D-GLu (Ma *et al.*, 2018; Weber *et al.*, 2016). Certains effecteurs spécialisés comme VgrG3 chez *V. cholerae* et VgrG2b chez *P. aeruginosa* ont également été montrés comme hydrolysant le peptidoglycane bien que leur mode d'action n'ait pas été détaillé (Brooks *et al.*, 2013; Hernandez *et al.*, 2020).

- les **transpeptidases** Tlde1 (Type VI L-D transpeptidase effector), identifiées chez *Salmonella enterica* et répandues chez les Protéobactéries, inhibent la biosynthèse du peptidoglycane *via* une activité L,D-carboxypeptidase et L,D-transpeptidase. La production de cette toxine chez *E. coli* altère la division cellulaire, menant à la formation de bactéries très allongées, et à terme à leur lyse (Sibinelli-Sousa *et al.*, 2020).

- une double activité **transglycosylase** et **endopeptidase** a récemment été associée à Tse4 chez *A. baumanii*. Cet effecteur est à l'origine d'une activité antibactérienne médiée par le SST6 exercée sur plusieurs espèces de bactéries Gram positif (*L. monocytogenes*, *S. aureus* et *B. subtilis*), phénomène jusqu'alors non décrit (Le *et al.*, 2021). Cette activité est stimulée en conditions alcalines, notamment en présence de D-lysine autosécrétée par *A. baumanii* (Le *et al.*, 2021).

3.3.2. Effecteurs ciblant les structures membranaires et périplasmiques

Les phospholipides sont les cibles privilégiées des effecteurs du SST6, notamment lorsqu'il s'agit de **phospholipases**, une classe de toxines fortement représentée chez les entérobactéries pathogènes. Il existe 5 classes de phospholipases Tle (Type VI lipase effector), Tle1-5, phylogénétiquement distinctes et classées selon leur mode d'action. Ces toxines Tle sont à l'origine d'interactions bactériennes antagonistes en hydrolysant les liaisons entre le glycérol et la queue des acides gras composant les phospholipides membranaires (Flaugnatti *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2014; Jurénas and Journet, 2021; Russell *et al.*, 2013). Les Tle1-4 sont des effecteurs possédant des activités phospholipases de type A₁ (clivant la position sn1 du glycérol) ou A₂ (clivant la position sn2) et comprennent un motif catalytique conservé (GxSxG). Au sein de ce motif, les trois résidus catalytiques conservés sont les acides aminés Ser-Asp-His (Hu *et al.*, 2014; Russell *et al.*, 2013).

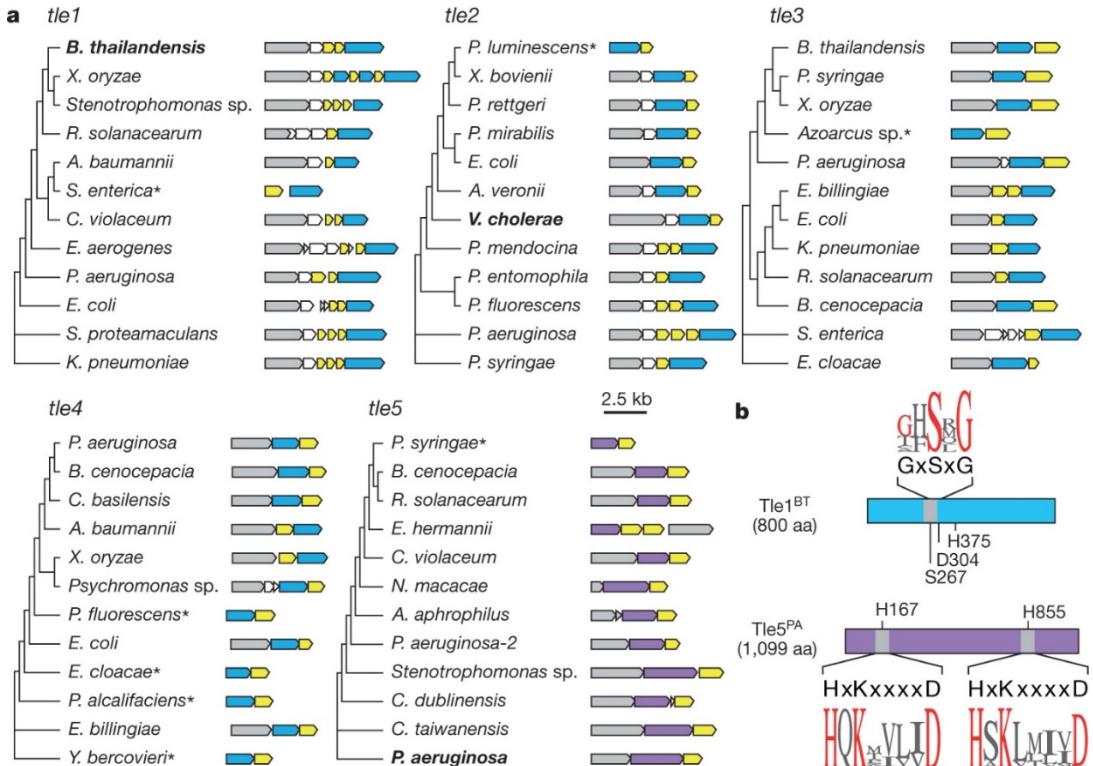


Figure 48. Distribution phylogénétique des effecteurs de type phospholipase au sein des bactéries Gram négatif et organisation génomique. (a) La superfamille des phospholipases est largement représentée au sein des espèces à Gram négatif, et se divise en 5 sous familles Tle1-5. Un code couleur est appliquée pour les différents gènes, gris : vgrG, bleu : tle possédant un motif catalytique de type GxSxG (b), violet : tle possédant un double motif catalytique HxKxxxxD (b) et jaune : tli (gènes encodant les protéines d'immunité). La longueur des branches n'est pas proportionnelle à la distance d'évolution. La présence d'astérisque précise l'absence de gènes codant pour VgrG à proximité de Tle. (b) Organisation des domaines catalytiques des phospholipases Tle1 retrouvée chez *B.thailandensis* (Tle1^{BT}) et Tle5 chez *P. aeruginosa* (Tle5^{PA}). Les régions grises démontrent l'emplacement des motifs catalytiques respectifs GxSxG et double HxKxxxxD avec leur séquence consensus respective, ainsi que la position des résidus catalytiques (S267, D304 et H375 pour Tle1^{BT}; H167 et H855 pour Tle5^{PA}) (D'après Russell et al., 2013).

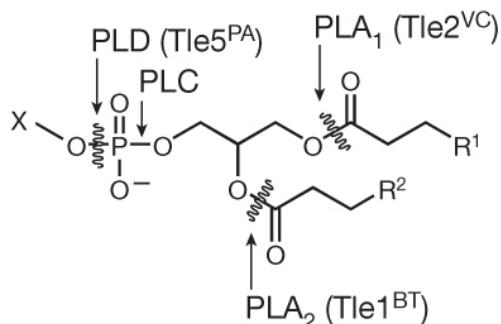


Figure 49. Différents modes de clivage des phospholipides selon le type de phospholipase. L'activité catalytique des phospholipases Tle1 retrouvée chez *B.thailandensis* (Tle1^{BT}) est de type A₂ (PLA₂) , tandis que la Tle2 présente chez *V. cholerae* (Tle2^{VC}) possède une activité phospholipase de type A₁ (PLA₁). Tle5 chez *P. aeruginosa* (Tle5^{PA}) est de type PLD (D'après Russell et al., 2013).

De cette famille, Tle1 est la phospholipase la plus étudiée, présente notamment chez *E. coli* EAEC, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, et *B. thailandensis* (Flaughnatti *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017; Russell *et al.*, 2013) (**Figure 48**). Tle1 possède une activité phospholipase de type A₂, responsable d'une déstructuration des membranes lors de son expression périplasmique chez les bactéries ne possédant pas d'antitoxines Tli1 (Hu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017; Russell *et al.*, 2013). Chez les EAEC, Tle1 présente à la fois une activité A₁ et A₂ (Flaughnatti *et al.*, 2016). Les phospholipases de type Tle5, capables d'hydrolyser les phospholipides entre un phosphate et le groupement principal (position sn3) (**Figure 49**), possèdent également une propriété bactériolytique et leur activité est neutralisée par la protéine d'immunité Tli5 (Jiang *et al.*, 2014; Russell *et al.*, 2013). Elles sont structuralement et fonctionnellement distinctes des phospholipases Tle1-4 car elles possèdent un motif catalytique double de nature HxKxxxxD (Jiang *et al.*, 2014; Russell *et al.*, 2013).

En plus des phospholipases de la famille Tle, VasX et TseL ont été identifiées chez *V. cholerae* comme délivrées de manière SST6-dépendante et possédant une activité lipase antibactérienne (Dong *et al.*, 2013; Miyata *et al.*, 2011). VasX est une toxine colicine-like; elle est responsable de la formation de pores dans les membranes des cellules bactériennes ciblées (Miyata *et al.*, 2013). De même, la lipase Tse4 de *P. aeruginosa* est responsable d'une dissipation du potentiel de membrane, ce qui perméabilise la cellule ciblée (LaCourse *et al.*, 2018). Enfin, Ssp6 est un effecteur du SST6 identifié chez *Serratia marcesens* qui est capable d'induire également la formation de pores *in vitro* dans des couches de lipides artificielles (Mariano *et al.*, 2019).

Chez *K. pneumoniae*, les phospholipases constituent une part majeure des effecteurs du SST6. Li *et al.* ont récemment estimé dans une étude *in silico* la prévalence des effecteurs avec une activité lipase chez *K. pneumoniae* à 71% (171/241 génomes analysés) (Li *et al.*, 2022). Plusieurs phospholipases ont été caractérisées chez *K. pneumoniae*, notamment Tle1^{KP}, retrouvée au sein du cluster SST6 de la souche multi-résistante HS11286, et qui lui confère une activité antibactérienne directe vis-à-vis d'*E. coli* (Liu *et al.*, 2017). La phospholipase PLD1 de type Tle5 a également été décrite chez la souche hypervirulente Kp52.145 et appartient à la sous-famille des cardiolipines synthases mais ne possède pas d'activité antibactérienne vis-à-vis d'*E. coli* (Lery *et al.*, 2014).

3.3.3. Effecteurs ciblant le cytoplasme

Certains effecteurs sécrétés par le SST6 ciblent spécifiquement le compartiment cytoplasmique des bactéries réceptrices et notamment les acides nucléiques ou les protéines essentielles à la division ou au métabolisme.

Les **nucléases** sont des effecteurs du SST6 catalysant l'hydrolyse non spécifique des acides nucléiques (ADN (DNases) ou ARN (RNases)) des cellules ciblées. Ces effecteurs, appelés Tde (Type VI DNase Effector), contiennent pour la plupart un motif HNH de 30 acides aminés permettant la mise en conformation spécifique des acides nucléiques pour permettre une hydrolyse efficace de l'ADN (Jurénas and Journet, 2021). Le déclenchement de la réponse SOS dans les cellules ainsi ciblées induit une inhibition de la croissance et de la formation de filaments (Jana *et al.*, 2019; Pissaridou *et al.*, 2018). Dans le cas des effecteurs Tde1 et Tde2 chez *A. tumefaciens*, ceux-ci possèdent un domaine nucléase de type toxine 43 et sont impliqués dans l'activité antibactérienne (Bondage *et al.*, 2016). C'est également le cas de Rhs1 et Rhs2 chez *Dickeya dadantii*, deux effecteurs spécialisés fusionnés à PAAR, qui possèdent des domaines C-terminaux dotés d'activité endonucléasique impliqués dans la dégradation d'ADN et l'inhibition de croissance des cellules réceptrices (Koskineni *et al.*, 2013). D'autres enzymes ciblant le matériel génétique sont sécrétées par le SST6. Chez *Burkholderia cenocepacia*, la **déaminase** DddA catalyse la déamination de la cytosine en uracile au niveau de l'ADN double brin et cet uracile représente une cible pour l'excision de base, faisant de cet effecteur une source de mutagénèse et donc de toxicité inter-bactérienne, notamment vis-à-vis de *E. coli* (Mok *et al.*, 2020). Chez *K. pneumoniae*, des domaines nucléases HNH, pyocines de type S et toxine 44, ont également été retrouvés *in silico* dans plusieurs génomes (Li *et al.*, 2022).

D'autres effecteurs ciblant le cytoplasme sont sécrétés *via* le SST6 et agissent sur des mécanismes clés de la division cellulaire. Par exemple, *Serratia proteomaculans* synthétise une **ADP-ribosyltransférase**, Tre1 (Type VI ADP-Ribosyltransferase effector) qui induit une modification post-traductionnelle de FtsZ, une protéine essentielle à la division cellulaire. Cette modification bloque la polymérisation de FtsZ et conduit donc à la mort des cellules ciblées (Ting *et al.*, 2018). L'action de Tre1 est contrée par la protéine d'immunité Tri1, qui peut, dans son cas très particulier, également neutraliser différentes toxines ADP-ribosylantes

(Ting *et al.*, 2018). Chez *Pseudomonas*, les toxines Tne (Type VI NADase effector) sont des **glycohydrolases** dégradant le NAD(P)+ en nicotinamide et en ADP-ribose. La baisse drastique de ce cofacteur intracellulaire induite par l'action de cet effecteur entraîne une inhibition de la croissance bactérienne (Whitney *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2018). Cette bactérie produit aussi une **pyrophosphate kinase**, la toxine Tas1 (Type VI effector (p)ppApp Synthetase) capable de phosphoryler l'ATP, l'ADP et l'AMP. L'action de cette toxine induit une accumulation de (p)ppApp et une forte déplétion en ATP, menant à un désordre métabolique et à la mort de la cellule (Ahmad *et al.*, 2019).

3.4. Modulation des communautés polymicrobiennes

La compétition entre différents individus au sein de communautés complexes telles que les microbiotes est un champ d'investigation de plus en plus fourni dans la littérature et les SST6 jouent un rôle important dans les équilibres de ces écosystèmes. Par exemple, l'étude du SST6 dans le phytobiote suggère sa forte implication dans l'établissement et la survie des bactéries bénéfiques pour la plante, mais aussi dans la protection vis-à-vis des phytopathogènes.

Bernal *et al.* ont démontré la capacité de *P. putida*, un saprophyte du sol capable de coloniser les plantes, à inhiber *in vitro* la croissance de plusieurs phytopathogènes (*A. tumefaciens*, *P. syringae*, *Xanthomonas campestris*) via son SST6, mais également *in planta* sur des feuilles de tabac, lors d'une co-incubation avec *X. campestris* (Bernal *et al.*, 2017). A l'inverse, le SST6-2 de *P. syringae* est capable de favoriser sa croissance et son fitness au détriment d'autres entérobactéries, mais aussi d'autres organismes et notamment des eucaryotes retrouvés communément dans les sols et les plantes comme les levures et les amibes (Haapalainen *et al.*, 2012). Enfin, la souche MFE01 de *P. fluorescens* utilise son SST6 pour protéger *in vivo* un modèle de tubercule de pommes de terre contre le phytopathogène *Pectobacterium atrosepticum*, renforçant le caractère PGPR de cette espèce bactérienne (Decoin *et al.*, 2015).

Ainsi le SST6 peut moduler l'équilibre des espèces au sein d'une communauté bactérienne et conduire aussi bien à une homéostasie qu'à une dysbiose. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux rôles du SST6 dans le dynamique du microbiote intestinal.

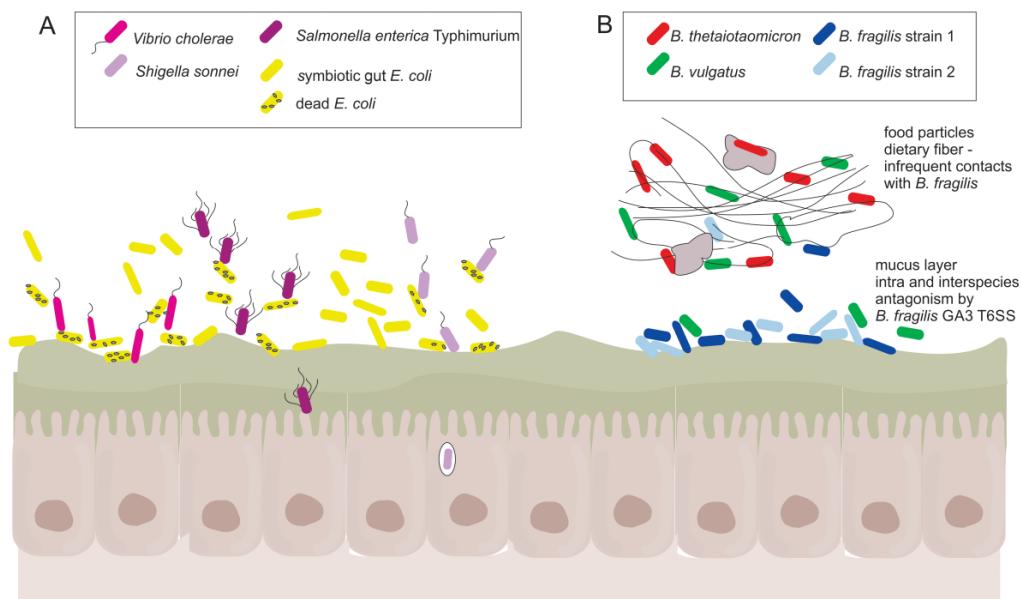


Figure 50. Antagonisme médié par le SST6 au sein du microbiote intestinal. (A) *V. cholerae*, *S. sonnei* et *S. Typhimurium* sont des pathogènes entériques capables d'utiliser leur SST6 pour aller cibler les commensaux du microbiote, dont *E. coli*, leur permettant la création d'une niche écologique propice à leur développement, et le passage de l'épithélium intestinal. (B) Le GA3 SST6 de *B. fragilis* commensal est capable d'inhiber la croissance de ses semblables pathogènes du fait de leur proximité au niveau de la couche de mucus. *B. vulgatus* est également ciblée par *B. fragilis* de manière SST6 dépendante, car partageant des niches nutritives semblables. En revanche, *B. thetaiotaomicron* n'est pas lysée par le SST6 de *B. fragilis* car ces deux espèces sont spatialement éloignées et n'occupent pas la même niche, les substrats nutritifs partagés devant être distincts (D'après Coyne and Comstock, 2019).

3.4.1. SST6 et colonisation de l'hôte : bataille au sein du microbiote

Le rôle du SST6 sur le microbiote de l'hôte est primordial pour l'établissement d'une niche écologique, celui-ci représentant une réelle arme pour les pathogènes. Les pathogènes entériques notamment doivent contourner la résistance à la colonisation établie par les individus du microbiote intestinal pour favoriser leur implantation (**Figure 50**). Le SST6 est largement répandu chez les Entérobactéries, dont plusieurs pathogènes incluant *S. enterica*, plusieurs pathovars *E. coli* ou encore *Citrobacter rodentium* (Coyne and Comstock, 2019; Russell *et al.*, 2014; Sana *et al.*, 2017; Serapio-Palacios *et al.*, 2022). Chez *S. Typhimurium*, le SST6 est nécessaire à la colonisation intestinale et est responsable de l'activité antibactérienne *in vitro* et *in vivo* contre un commensal du microbiote murin, *Klebsiella oxytoca* (Sana *et al.*, 2016b). Cette compétition est médiée par l'amidase Tae4 et pourrait être expliquée par l'établissement d'une compétition vis-à-vis de nutriments, du fait de la capacité de ces deux espèces à métaboliser les mêmes oses *in vivo* (Faber *et al.*, 2016). Le rôle pivot du SST6 dans la colonisation intestinale a également été démontré chez *Shigella sonnei*, qui possède un avantage compétitif à la fois *in vitro* et *in vivo* sur son homologue *Shigella flexneri* dépourvu de SST6. Le SST6 de *S. sonnei* est également requis pour la persistance de la bactérie au sein du colon murin (Anderson *et al.*, 2017). Chez *V. cholerae*, un domaine peptidoglycane hydrolase en C-terminal de VgrG3 favorise la colonisation intestinale chez la souris et le lapin, notamment au niveau du segment médian du petit intestin du lapin ce qui suggère une action spécifique de cet effecteur sur des bactéries potentiellement compétitrices (Fu *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2018).

A l'inverse, les commensaux du microbiote peuvent eux aussi se défendre vis-à-vis des bactéries pathogènes de manière SST6 dépendante. Comme vu précédemment, les Bacteroidetes constituent entre 20 et 80% du microbiote fécal chez l'Homme et sont représentés majoritairement par des bactéries du genre *Bacteroides*. Les Bacteroidetes commensaux possèdent un cluster SST6 conservé (T6SSⁱⁱⁱ), distinct de celui retrouvé chez les Protéobactéries (T6SSⁱ) et Francisella (T6SSⁱⁱ) (Boyer *et al.*, 2009; Bröms *et al.*, 2013; Russell *et al.*, 2014). Coyne *et al.* ont identifié la présence de 130 locus SST6 au sein de 205 génomes de Bacteroidales intestinaux humains ; ils s'articulent autour de 3 architectures génétiques différentes (GA1, GA2 et GA3), et suggèrent environ un quart des bactéries du microbiote encodant au moins un SST6 (Coyne *et al.*, 2016; Coyne and Comstock, 2019). De plus, les

auteurs montrent une capacité de transférabilité des éléments composant le SST6 entre les différentes espèces appartenant aux Bacteroidales, soulignant l'importance des échanges de ces gènes *in vivo* au sein du microbiote. *B. fragilis* cible plusieurs espèces de Bacteroidales *via* son GA3-SST6 *in vitro*. Ce SST6 est également actif *in vivo*, confirmant son rôle majeur dans la modulation de cet environnement polymicrobien complexe (Coyne *et al.*, 2016; Chatzidaki-Livanis *et al.*, 2016). Enfin, il a été rapporté qu'une souche commensale non toxinogène de *B. fragilis* est capable d'utiliser son SST6 *in vivo* contre une autre de souche de *B. fragilis* pathogène entérotoxinogène. Le déploiement du SST6 par les commensaux permet donc d'accroître la résistance à la colonisation souche-spécifique médiée par le microbiote intestinal, prévenant un déclenchement de colite chez la souris (Hecht *et al.*, 2016).

3.4.2. Influence du SST6 sur la capacité à former du biofilm

Le rôle du SST6 dans la formation de biofilm a été établi chez plusieurs espèces. La délétion des gènes codant les protéines TssJ et TssM, composants essentiels à la machinerie moléculaire du SST6, entraîne une inhibition de la capacité à former du biofilm chez des souches d'*E. coli* EAEC et APEC, respectivement (de Pace *et al.*, 2011; Aschtgen *et al.*, 2008). Chez *P. fluorescens*, un mutant $\Delta tssC$ inhibé dans la synthèse de la queue contractile est également inhibé dans sa capacité à former des biofilms mais de façon contradictoire, la délétion du gène *tssM*, un composant du complexe membranaire, entraîne un effet contraire chez *P. aeruginosa* (Gallique *et al.*, 2017b; Lin *et al.*, 2015). Chez *Acinetobacter baumanii*, la capacité à former du biofilm est diminuée pour des souches cliniques possédant le SST6 comparativement à celles ne le possédant pas (Dong *et al.*, 2022). Cependant, chez *K. pneumoniae*, la présence d'un SST6 n'est pas associée à une plus grande formation de biofilm par rapport aux souches SST6 négatives (Zhang *et al.*, 2022).

Au sein d'un biofilm polymicrobien, le SST6 de *P. fluorescens* MFE01 entraîne une inhibition de la croissance d'une autre souche de *P. fluorescens* MFP05 (Gallique *et al.*, 2017b). Le SST6 de *P. fluorescens* est d'autant plus important qu'il joue également un rôle dans la motilité de type swimming, au vu de la perte des flagelles pour des mutants MFE01 $\Delta hcp1$ et MFE01 $\Delta tssC$ (Bouteiller *et al.*, 2020; Decoin *et al.*, 2015). Ce même SST6 de *P. fluorescens* est également impliqué dans la capacité antibactérienne vis-à-vis d'autres bactéries *via* la sécrétion de Hcp2 (Decoin *et al.*, 2014), représentant un réel avantage au sein des

communautés polymicrobiennes retrouvées dans les biofilms. De même, la co-culture d'une souche *Pseudomonas putida* avec *Burkholderia thailandensis* induit l'élimination de cette dernière espèce au sein d'un biofilm mixte. Ce phénomène n'est pas observé si *B. thailandensis* possède un SST6 (Schwarz *et al.*, 2010).

Le SST6 est donc impliqué dans la formation de biofilm mais aussi dans la compétition bactérienne entre les différentes espèces le composant. Cette double capacité est possible grâce au lien entre SST6 et quorum sensing (QS). Le QS est ainsi impliqué dans la régulation de l'expression des SST6 chez *V. cholerae* et *P. aeruginosa* (Pena *et al.*, 2019). Il pourrait à la fois intervenir en tant que dispositif de reconnaissance / communication cellule-cellule, mais aussi en tant que senseur de l'environnement extérieur pour permettre l'activation du SST6 (Gallique *et al.*, 2017a; Pena *et al.*, 2019). Cependant, le SST6 lui-même peut agir comme un senseur de la population bactérienne, permettant de distinguer les cellules du soi des cellules du non-soi. Chez *Proteus mirabilis*, deux souches ne possédant pas le même système toxine antitoxine, se reconnaissent en tant qu'« ennemis », bien que de la même espèce, et entrent en compétition *via* le SST6 (Alteri *et al.*, 2017). Ce phénomène fut caractérisé bien avant la connaissance de son lien avec le SST6, par la mise en évidence de « lignes de Dienes » formées entre des colonies mobiles sur milieu semi-gélosé (Alteri *et al.*, 2013; Dienes, 1946, 1947). Ainsi, deux comportements de la bactérie peuvent être adoptés vis-à-vis de l'utilisation de leur SST6 : défensif ou offensif. Par exemple, le H1-SST6 de *P. aeruginosa* s'assemble après détection de dommages membranaires liés à une agression (Basler *et al.*, 2013; Ho *et al.*, 2014). *P. aeruginosa* discerne les attaques médiées par les bactéries de la même espèce, et attaque uniquement en réponse à l'attaque médiée par le SST6 de *V. cholerae* et *A. baylyi*, ces deux dernières espèces utilisant leur SST6 de manière offensive (Basler and Mekalanos, 2012; Basler *et al.*, 2013). De la même façon, *V. fischerii* synthétise une lipoprotéine, TasL, impliquée dans le contact cellule-cellule, permettant de sélectionner les individus avec qui une compétition SST6 doit s'établir (Speare *et al.*, 2022). En plus d'être un système de communication efficace, le SST6 peut également être un atout dans l'acquisition « d'outils » depuis son environnement pour favoriser sa survie, comme des acides nucléiques ou encore des ions métalliques.

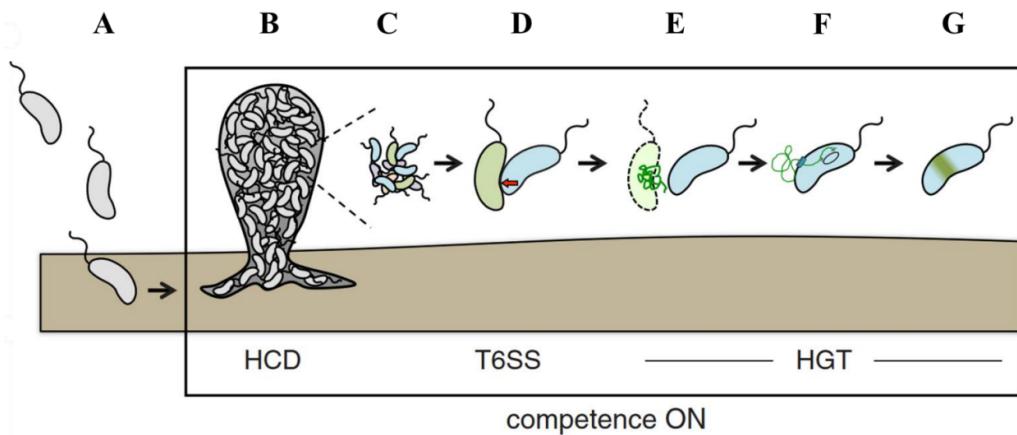


Figure 51. Transfert horizontal de gènes et acquisition de matériel génétique médié par le SST6 chez *V. cholerae*. (A) *V. cholerae* va adhérer initialement à un support chitineux pour ainsi (B) entamer la formation d'un biofilm jusqu'à atteindre un seuil de densité bactérienne (HCD = High Cell Density) faisant intervenir les phénomènes de quorum sensing. (C) Au sein de ce biofilm polymicrobien, tous les individus ne possédant pas les protéines de l'immunité nécessaires à la résistance aux effecteurs du SST6 vont être ciblés par le SST6, celui-ci faisant parti du régulon de compétence chez *V. cholerae* (D). Le SST6 est ainsi actif contre les bactéries proies ne possédant pas d'antitoxines, provoquant la lyse des bactéries (E, F, G) et la libération du contenu en ADN dans le milieu extracellulaire. Le matériel génétique ainsi libéré est ensuite capté par la cellule attaquante via un transfert horizontal de gène (HGT) et incorporé dans son génome pour lui conférer un avantage sélectif (Adapté de Borgeaud et al., 2015).

3.5. SST6 : un outil d'évolution et le fitness bactérien

3.5.1. Acquisition de matériel génétique exogène

La capacité à acquérir du matériel génétique depuis l'environnement extérieur est un élément déterminant pour la survie des pathogènes mais aussi leur évolution, *via* l'acquisition de nouvelles compétences (facteurs de virulence, résistances aux antibiotiques). Le pourcentage important en GC des opérons codant les SST6 est ainsi en faveur d'une intégration récente *via* des phénomènes de transferts horizontaux (Bingle *et al.*, 2008; Boyer *et al.*, 2009; Journet and Cascales, 2016). D'autres arguments confortent cette hypothèse : l'existence de plusieurs gènes codant des protéines d'immunité, ou de gènes codant les systèmes toxines antitoxines, isolés et/ou groupés en clusters pouvant être transférés d'une bactérie attaquante à une bactérie prédatrice (Thomas *et al.*, 2017).

Les SST6s peuvent être eux-mêmes impliqués d'une façon plus indirecte dans l'acquisition de gènes. En effet, il a été montré pour la première fois en 2015 que *V. cholerae* est capable d'utiliser la compétition inter bactérienne médiée par le SST6 pour lyser les cellules adjacentes, libérant ainsi le contenu génétique de la cellule cible dans le milieu extérieur. Cet ADN peut ensuite être incorporé par un processus de transformation mis en place en parallèle de l'expression du SST6 (Borgeaud *et al.*, 2015) (**Figure 51**). Les auteurs de cet article montrent en effet que la régulation de l'opéron SST6 chez *V. cholerae* est dépendante des régulateurs TfoX et QstR, des protéines qui interviennent également dans la régulation de la compétence naturelle et du quorum sensing, suggérant la survenue concomitante de ces événements au sein de communautés organisées en biofilm (Teschler *et al.*, 2022). L'acquisition de gènes *via* le SST6 est aussi décrite chez *Acinetobacter baylyi*, capable d'utiliser son SST6 pour induire la lyse d'*E. coli* et récupérer des gènes hétérologues. Ce phénomène est assez fréquent pour pouvoir être observé en temps réel au microscope, ce qui pourrait en partie expliquer l'acquisition rapide de gènes de résistance aux antibiotiques au sein de ce genre bactérien et le développement de souches multi-résistantes (Cooper *et al.*, 2017; Dong *et al.*, 2022). En effet, les bactéries du genre *Acinetobacter*, fréquemment retrouvées dans les infections nosocomiales multi-résistantes possèdent un SST6 (Weber *et al.*, 2013). Ces phénomènes peuvent donc être à l'origine d'un remodelage global des communautés microbiennes.

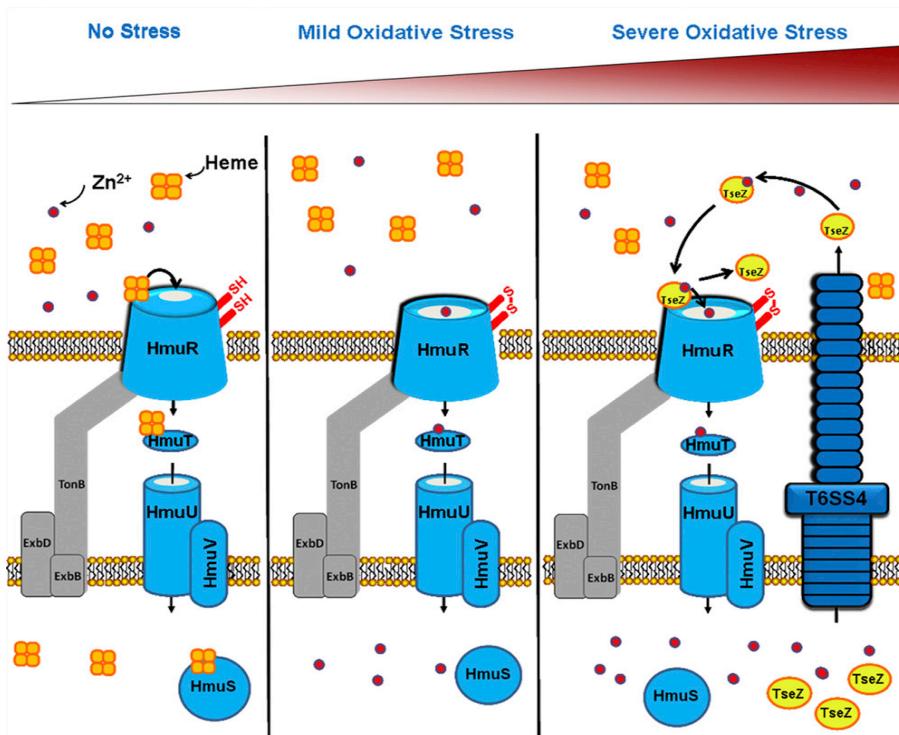


Figure 52. Acquisitions d’ions Zn^{2+} médié par le SST6-4 de *B. thailandensis*. En l’absence de stress oxydatif, HmuR est un transporteur TonB-dépendant régulé par les niveaux de potentiels redox, destiné au transport du hème ferrique au sein de la cellule (**gauche**). En conditions de stress oxydatif, celui-ci « switch » en formant un pont disulfide, et permet de débuter l’incorporation de zinc sous forme d’ions Zn^{2+} depuis l’environnement extérieur (**centre**). TseZ est un effecteur sécrété par le SST6-4 et joue le rôle d’intermédiaire entre les ions Zn^{2+} captés dans le milieu extracellulaire, et permet de les amener jusqu’au transporteur conditionné HmuR, permettant son transport intracellulaire (**D’après Si et al., 2017b**).

3.5.2. Acquisitions de métaux et d'ions

En tant que machinerie sécrétoire, le SST6 pourrait également jouer un rôle dans la récupération d'éléments essentiels pour la cellule bactérienne, notamment en situation de stress. Les effecteurs impliqués sont alors sécrétés dans l'environnement extérieur et servent de chélateurs. C'est le cas de l'effecteur TseM, sécrété par le SST6-4 de *B. thailandensis* et capable de chélater des ions manganèse (Mn^{2+}) extracellulaires. Le complexe TseM- Mn^{2+} est alors capté par un transporteur TonB-dépendant (MnoT) qui permet l'import actif du manganèse à l'intérieur de la cellule (Si *et al.*, 2017b). Toujours chez *B. thailandensis*, le même SST6-4 est responsable de la sécrétion de TseZ, un effecteur liant les ions zinc (Zn^{2+}) et interagissant avec HmuR, un transporteur de l'hème ferrique en absence de conditions oxydatives (Si *et al.*, 2017a) (**Figure 52**). TseZ est un homologue de YezP identifié préalablement chez *Y. pseudotuberculosis*, qui est également un chélateur d'ions zinc sécrété via le SST6-4 (Wang *et al.*, 2015). De manière similaire, *P. aeruginosa* sécrète des chélateurs d'ions fer (Fe^{3+}) et cuivre (Cu^{2+}), TseF et Azu, impliqués dans l'acquisition de ces métaux nécessaires à la croissance bactérienne (Han *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2017). La survie des pathogènes sécrétant ce genre de chélateurs serait alors favorisée dans des environnements où ces métaux sont relativement peu disponibles.

La régulation des SST6 est orchestrée pour répondre aux besoins de survie, d'adaptation et de colonisation de la bactérie. L'assemblage de la machinerie moléculaire et la sécrétion d'effecteurs étant un processus métaboliquement coûteux, il doit être réalisé de façon contrôlée et ordonnée.

4. Régulation du SST6

La régulation des îlots de pathogénicité du SST6 font intervenir des processus majoritairement transcriptionnels. D'autres aspects de régulations post -traductionnels et post-transcriptionnels ont également été décrits, notamment chez *Pseudomonas* (Bernard *et al.*, 2010; Hsu *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2013; Mougous *et al.*, 2006). Dans la suite de cette partie, les mécanismes de régulation abordés sont ceux retrouvés majoritairement chez les entérobactéries et pathogènes entériques, dont *K. pneumoniae*.

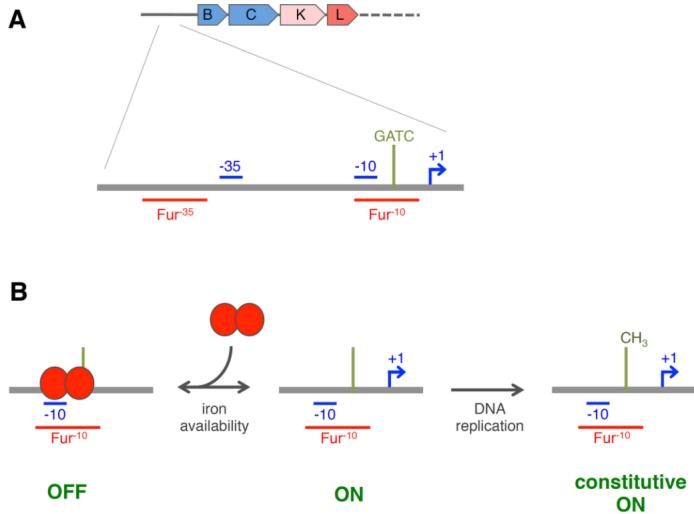


Figure 53. Régulation par le fer du SST6 chez *E. coli* EAEC : le répresseur Fur. (A) Représentation schématique du promoteur de l'opéron *sci1* du SST6 de *E. coli* EAEC. (B) En présence de fer, les dimères de Fur se lient à la séquence consensus Fur^{10} elle-même chevauchant la boîte -10 du promoteur, empêchant la transcription. Lorsque la disponibilité en fer est limitée la disponibilité de la boîte -10 permet la fixation de l'ARN polymérase et la transcription de l'opéron *sci1*. De plus, lors de la réplication, le site GATC est méthylé par un CH_3 , ce qui empêche la fixation de Fur, et permettant l'expression constitutive du SST6 (D'après Journet and Cascales, 2016).

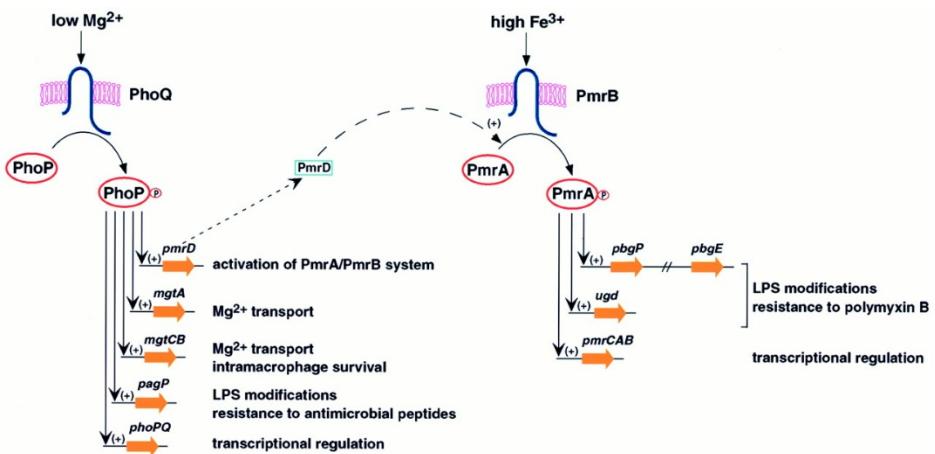


Figure 54. Exemple de régulation médiée par un système à deux composants : le système PhoPQ. Chez *Salmonella*, le système PhoPQ réagit notamment à la concentration de Mg^{2+} extracellulaire. Lorsque celle-ci est basse, le senseur PhoQ induit la phosphorylation de la protéine effectrice PhoP. Ainsi, la régulatrice PhoP phosphorylée va permettre la transcription d'un ensemble de gènes impliqués dans le transport, la modification du LPS ou encore la résistance aux antibiotiques. En outre, PmrAB est un autre système à deux composants co-régulé par PmrD, dont l'expression est régie par PhoPQ (D'après Groisman, 2001).

4.1. Mécanismes de la régulation du SST6

4.1.1. Homéostasie du fer : le régulateur Fur

Le fer est un élément essentiel à la croissance des bactéries, mais également un acteur de la régulation pour plusieurs gènes *via* le régulateur transcriptionnel Fur (Ferric uptake regulator). Fur se complexe au fer disponible dans le milieu pour se dimériser et reconnaître, sous cette forme, des séquences consensus de certains promoteurs (Fur^{10} et Fur^{35}) afin d'inhiber la transcription en bloquant l'accès à l'ARN polymérase (Carpenter *et al.*, 2009). Concernant le SST6, Fur a été décrit comme un répresseur transcriptionnel du cluster *sci1* chez *E. coli* entéroaggrégatifs (EAEC) (Brunet *et al.*, 2011). De plus, des modifications épigénétiques médiées par une ADN méthyltransférase (Dam) s'ajoutent à l'action du répresseur Fur pour co-réguler l'expression du SST6 et la réPLICATION bactérienne (Brunet *et al.*, 2011, 2020; Journet and Cascales, 2016) (**Figure 53**). De même, l'expression du H2-SST6 de *P. aeruginosa*, impliqué dans les interactions avec les cellules eucaryotes, est réprimée par Fur (Sana *et al.*, 2012). Chez *S. Typhimurium*, le régulateur Fur se lie à la région promotrice de *cplV* et inhibe ainsi les capacités antibactériennes et la virulence liées au SST6 (Wang *et al.*, 2019). Chez *K. pneumoniae* et contrairement aux autres espèces, le régulateur Fur a été montré comme activant le SST6 car la délétion du gène codant Fur (Δfur) entraîne la perte de l'activité antibactérienne vis-à-vis d'*E. coli* (Storey *et al.*, 2020).

4.1.2. Les systèmes à deux composants

Les systèmes à deux composants sont des voies majeures de signalisation chez les bactéries en agissant comme des senseurs en réponse aux stress de l'environnement. Ils sont généralement composés de deux éléments intimement liés : un senseur situé à la périphérie de la cellule, qui, en réponse à un stress, induit la phosphorylation d'une protéine régulatrice pouvant alors se fixer aux unités transcriptionnelles cibles. C'est le cas notamment du système à deux composants PhoPQ, capable de répondre à différents stress (concentration en ions Mg^{2+} et Ca^{2+} , pH acide, présence de peptides antimicrobiens, variations osmotiques) (Lu *et al.*, 2020) (**Figure 54**). Chez *V. cholerae*, l'action antibactérienne du SST6 et la sécrétion de son effecteur TseH sont augmentées en présence d'ions Mg^{2+} , et cette régulation est dépendante du système PhoPQ capable de jauger la quantité de métaux dans l'environnement (Tang *et al.*, 2022). D'autres systèmes à deux composants sont impliqués dans la régulation des gènes

Gene silencing mechanism of H-NS:

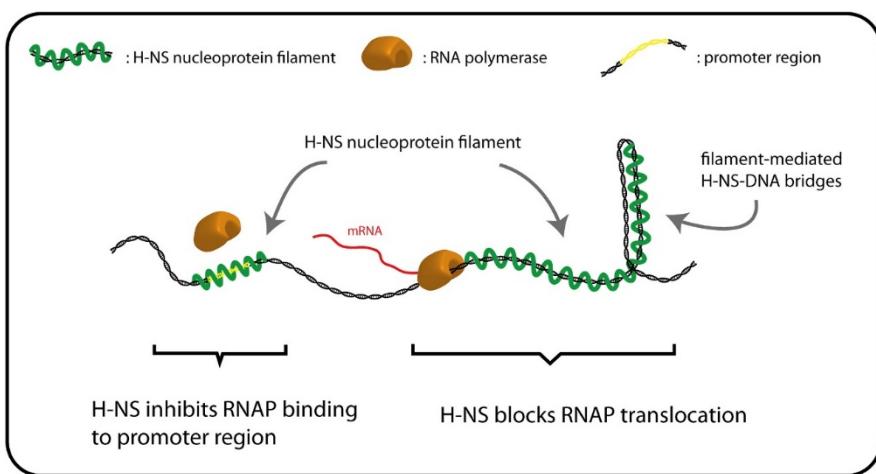


Figure 55. Mécanisme d'inhibition de la transcription par H-NS. L'inhibition de la transcription par H-NS peut s'effectuer de deux manières, soit en bloquant la fixation de l'ARN polymérase au niveau de la séquence promotrice, soit en bloquant la transcription par formation de filaments nucléoprotéiques. Ces filaments peuvent être associés à l'ADN pour former des ponts, inhibant la transcription (D'après Winardhi et al., 2015).

composant le SST6 chez *S. Typhimurium* (SPI-6) comme SsrA/B. SsrB agit comme un répresseur du SST6, en se fixant sur la région promotrice du SPI-6 (Parsons and Heffron, 2005; Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010). Chez *K. pneumoniae*, PhoPQ régule positivement le SST6 lors de la compétition inter-bactérienne contre des proies possédant également un SST6 (Storey *et al.*, 2020). Le domaine périplasmique du senseur PhoQ joue un rôle important dans l'activation du SST6 de *K. pneumoniae*, en réponse à la présence d'une autre bactérie possédant un SST6 (Storey *et al.*, 2020).

4.1.3. Les protéines de type histones : H-NS et H-NS like

La protéine de type histone (H-NS) est un régulateur transcriptionnel global. H-NS agit généralement comme un répresseur en se liant aux régions d'ADN riches en bases A-T (Ali *et al.*, 2012) (**Figure 55**). Le SST6 SPI-6 de *S. Typhimurium* est régulé par H-NS ; dans un modèle de compétition, un mutant Δhns présente une meilleure activité antibactérienne médiée par le SST6 en intra- et inter-espèce comparativement à la souche WT (Brunet *et al.*, 2015a). De même, la délétion du gène *hns* chez une souche hypervirulente NTUH-K2044 de *K. pneumoniae* conduit à la fois à une augmentation de l'expression du gène *hcp* et de la sécrétion de la protéine correspondante (Hsieh *et al.*, 2019). Barbosa et Lery ont également confirmé *in silico* que cette protéine H-NS régule le SST6 de *K. pneumoniae* (Barbosa and Lery, 2019). La répression de l'expression du SST6 par H-NS est en fait largement répandue chez d'autres bactéries comme *Pseudomonas*, *Vibrio* ou encore *Acinetobacter* (Eijkelkamp *et al.*, 2013; Renzi *et al.*, 2010; Salomon *et al.*, 2014).

4.2. Stress environnementaux modulant l'expression du SST6

Les différents régulateurs présentés ci-dessus répondent à des stress environnementaux vis-à-vis desquels les bactéries peuvent répondre en déployant leur SST6.

4.2.1. Nécessité de contact ?

Récemment, il a été mis en évidence que *Acinetobacter baylyi* et *Burkholderia thailandensis* assemblent leur SST6 de deux façons : de façon indépendante ou non d'un contact cellule-cellule (Lin *et al.*, 2022). Dans ce dernier cas de figure, l'assemblage est réalisé au point précis de contact entre les deux cellules, et dépend de TsIA (Type VI secretion dynamic localization protein A), une protéine périplasmique qui permet l'initiation de l'assemblage du SST6 de manière contact-dépendante. De plus, OmpA, une porine située dans

la membrane externe et possédant une extrémité dans l'espace périplasmique, est également nécessaire dans l'assemblage du SST6, renforçant l'hypothèse selon laquelle les récepteurs au niveau membranaire jouent un rôle crucial dans l'initiation de la biosynthèse du SST6 (Lin *et al.*, 2022).

4.2.2. Molécules antibactériennes

La présence de molécules antimicrobiennes (xénobiotiques ou naturelles) a également été montrée comme stimulant l'activité du SST6 chez plusieurs espèces. Le SST6 de *K. pneumoniae* HS11286 est actif en présence de différentes β -lactamines (ampicilline, méropénème, ceftazidime) (Liu *et al.*, 2017). D'autres antibiotiques (colistine et polymyxine B) ainsi que des peptides antimicrobiens (β défensine 3 humaine) ont montré leur capacité à stimuler l'expression des gènes du SST6 chez *K. pneumoniae* (Storey *et al.*, 2020). Toutes ces molécules perturbent l'intégrité membranaire de la cellule bactérienne, ce qui pourrait représenter un signal d'activation pour des régulateurs comme le système PhoPQ chez *K. pneumoniae* (Storey *et al.*, 2020).

4.2.3. Conditions retrouvées *in vivo*

L'implication du SST6 dans la colonisation de l'hôte a été démontrée en modèle *in vivo* chez *V. cholerae*, *S. Typhimurium* ou encore chez *K. pneumoniae*, suggérant la présence de stress activant le SST6, notamment au niveau intestinal (Hsieh *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2013; Ma and Mekalanos, 2010; Zhao *et al.*, 2018). Par exemple, chez *V. cholerae*, la présence de mucines active l'expression de l'opéron SST6 et permet d'observer une activité antibactérienne intra-espèce (Bachmann *et al.*, 2015). La capacité des mucines à activer le SST6 est inhibée par l'activité des acides biliaires secondaires (acide cholique et déoxycholique), produits de dégradation des acides biliaires primaires par les bactéries du microbiote intestinal (*Bifidobacterium*) (Bachmann *et al.*, 2015). Le SST6 SPI-6 de *S. Typhimurium* est actif *in vivo* et nécessaire pour une colonisation efficace de l'intestin murin (Liu *et al.*, 2013; Sana *et al.*, 2016b). Contrairement à *V. cholerae*, la présence de 0.05% de sels biliaires permet d'accroître la capacité antibactérienne *in vitro* et *in vivo* du SST6 de *S. Typhimurium* contre des bactéries isolées du microbiote (*E. coli*, *K. oxytoca*, *K. variicola*) (Sana *et al.*, 2016b).

Chez *K. pneumoniae*, aucune étude reliant un composant du tractus digestif et l'activation du SST6 n'est disponible. Cependant, le SST6 de la souche hypervirulente NTUH-K2044 est nécessaire à la colonisation intestinale et à la dissémination de la bactérie dans le foie et la rate en modèle murin (Hsieh *et al.*, 2019). De plus, un mutant déléte de *icmF*, (*tssM*) présente une diminution de ses capacités d'adhésion et d'invasion vis-à-vis de cellules épithéliales intestinales Caco-2. Ceci est lié à une co-régulation du SST6 et des adhésines impliquées, *i.e.* des fimbriae de type I reconnaissant des résidus mannose à la surface des cellules (Hsieh *et al.*, 2019). Ainsi, un contact cellulaire pourrait être à l'origine de l'activation du SST6, comme chez *S. Typhimurium* ou *E. coli* EAEC, où le contact avec des macrophages induit respectivement l'expression des gènes du SST6 SPI-6 chez *S. Typhimurium*, et SST6-3 chez les EAEC (Journet and Cascales, 2016). De plus, un ensemble de sites de fixation de régulateurs transcriptionnels a été retrouvé au sein des opérons SST6 chez 3 souches de *K. pneumoniae*, partageant des traits d'hypervirulence et de multi-résistance (Barbosa and Lery, 2019). Parmi les potentiels régulateurs identifiés *in silico*, OxyR, un régulateur transcriptionnel impliqué dans la réponse au stress oxydatif, a été identifié, suggérant une activation du SST6 en conditions de stress oxydatif. En faveur de cette hypothèse, Storey *et al.* ont démontré que l'effet toxique médié par l'effecteur VgrG4 était dépendant de la réponse aux espèces réactives à l'oxygène (ROS), sous le contrôle du régulon *soxS* et du gène *oxyR* (Storey *et al.*, 2020). De plus, la production de VgrG4 dans un système hétérologue chez *E. coli* induit également une surexpression du gène *oxyR*, confirmant que la production de ROS stimule la sécrétion de VgrG4 et permet l'induction d'une activité antibactérienne (Storey *et al.*, 2020).

TRAVAIL EXPERIMENTAL



Publication N°2

Role of *Klebsiella pneumoniae* Type VI secretion system (T6SS) in long-term gastrointestinal colonization

Thomas Merciecca¹, Stéphanie Bornes², Laurence Nakusi¹, Sébastien Theil², Olaya Rendueles³, Christiane Forestier¹, and Sylvie Miquel¹

¹ Université Clermont Auvergne, CNRS, LMGE, 63000 Clermont–Ferrand, France.

² Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup, UMRF, 63000 Clermont–Ferrand, France.

³ Institut Pasteur, Université de Paris, CNRS, UMR3525, Microbial Evolutionary Genomics,
75015 Paris, France.

Publication acceptée le 27/09/2022 dans le journal **Scientific Reports**



OPEN

Role of *Klebsiella pneumoniae* Type VI secretion system (T6SS) in long-term gastrointestinal colonization

Thomas Merciecca¹, Stéphanie Bornes², Laurence Nakusi¹, Sébastien Theil², Olaya Rendueles³, Christiane Forestier¹ & Sylvie Miquel¹✉

Type VI secretion systems (T6SS), recently described in hypervirulent *K. pneumoniae* (hvKp) strains, are involved in bacterial warfare but their role in classical clinical strains (cKp) has been little investigated. In silico analysis indicated the presence of T6SS clusters (from zero to four), irrespective of the strains origin or virulence, with a high prevalence in the *K. pneumoniae* species (98%). In the strain CH1157, two T6SS-apparented pathogenicity islands were detected, T6SS-1 and -2, harboring a phospholipase-encoding gene (*tla1*) and a potential new effector-encoding gene named *tke* (Type VI *Klebsiella* effector). *Tla1* expression in *Escherichia coli* periplasm affected cell membrane permeability. T6SS-1 isogenic mutants colonized the highest gastrointestinal tract of mice less efficiently than their parental strain, at long term. Comparative analysis of faecal 16S sequences indicated that T6SS-1 impaired the microbiota richness and its resilience capacity. Oscillospiraceae family members could be specific competitors for the long-term gut establishment of *K. pneumoniae*.

Klebsiella pneumoniae is an opportunistic Gram-negative pathogen that is considered by the World Health Organization (WHO) and the Center for Disease Control and Prevention (CDC) to be a major health threat. Classical clinical isolates are responsible for hospital-acquired infections such as urinary tract infections, pneumonia, meningitis and endophthalmitis. *K. pneumoniae* is responsible for severe disseminated infections after broad-spectrum antibiotic treatment¹, partly due to its intrinsic resistance to β-lactam antibiotics combined with recently acquired resistance to carbapenems^{2,3}. Hypervirulent *K. pneumoniae* (hvKp) are also responsible for severe community-acquired infections and are particularly associated with pyogenic liver abscesses^{4–6}. Their enhanced virulence is due to the overproduction of factors such as siderophores and capsular polysaccharides. The hypervirulence phenotype is linked to the presence of a plasmid (pLVPK) that harbors several genes or operons (*rmpA*, *magA* and *iuc* and *iuc* operons) involved in the synthesis of virulence factors^{7–10}. *K. pneumoniae* is able to survive in different environments such as soil, plants, dust, and water^{11,12}, and human infections are usually preceded by gastro-intestinal colonization¹. The mechanisms allowing *K. pneumoniae* to establish within the intestinal microbiota are poorly understood but they are likely to require a competitive advantage over resident intestinal microbiota¹³.

In Gram-negative pathogens, secretion systems are involved in bacterial fitness^{14–16}. The Type VI Secretion System (T6SS) was initially described in *Vibrio cholerae* as an extracellular protein translocation system¹⁷ and has since been largely documented in Bacteroidetes and Proteobacteria, especially in Enterobacteriaceae¹⁸. It consists of a molecular syringe functionally and structurally related to the contractile tail of bacteriophages¹⁹. T6SS apparatus is composed of three major subunits: a periplasmic anchored baseplate complex, an inner syringe made up of Hcp protein hexamers fixed to a VgrG/PAAR protein tip complex acting like a puncture device. Once fully assembled, the TssBC contractile tube engulfs the inner syringe leading to the T6SS effector extrusion. After contraction, an ATPase, ClpV, is engaged to recycle the different subunits allowing further attacks²⁰. Bacteria harboring T6SS are thus able to inject toxic effectors in adjacent cells via direct contact leading to the death of preys²¹. Different kinds of effectors have been described according to their mode of action including DNase, phospholipase, glycoside, and hydrolase²². Each toxic effector has an associated cognate immunity protein that prevents T6SS-carrying bacteria from self-intoxication and acts as a paired toxin-antitoxin system^{22,23}.

¹Université Clermont Auvergne, CNRS, LMGE, 63000 Clermont-Ferrand, France. ²Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup, UMRF, 63000 Clermont-Ferrand, France. ³Institut Pasteur, Université de Paris, CNRS, UMR3525, Microbial Evolutionary Genomics, 75015 Paris, France. ✉email: sylvie.miquel@uca.fr

The presence of T6SS confers an advantage in highly competitive environments such as host gut microbiota^{24,25}. For instance, the intestinal pathogen *Salmonella* Typhimurium T6SS provides antibacterial activity against specific gut microbiota individuals such as *K. oxytoca* and *K. variicola*, suggesting that it kills microbiota members to invade the mice gut²⁶. *Shigella sonnei* is also able to use its T6SS to eliminate gut competitors in vivo (*E. coli* and *Shigella flexneri*) in mice²⁷.

Sarris et al. provided first evidence of T6SS in *K. pneumoniae* species in 2011²⁸. The first *K. pneumoniae* T6SS effector, a phospholipase (Pld1), was then identified and its role in pulmonary infection was demonstrated in a murine model using a *pld1* deletion mutant strain²⁹. More recently, analysis of 107 fully sequenced genomes of *K. pneumoniae* identified 254 T6SS related clusters³⁰, and their presence was positively correlated with the hypervirulent phenotype^{31,32}. T6SS are conserved worldwide across the genome of *K. pneumoniae* sequence type 258 (ST258) causing health-care-associated pneumonia³³. In vitro intra- and inter-species antibacterial activities have been associated with T6SS expression, and a phospholipase (Tle1^{KP}) was identified as the effector of the multidrug resistant strain HS11286 and a toxin-antitoxin system including a phospholipase effector (Tle1^{KP}) and its cognate immunity protein (Tli1^{KP}) was identified in the multidrug resistant strain HS11286, conferring Tle1^{KP} resistance³⁰. Other phospholipase T6SS effectors have already been identified in *K. pneumoniae* species (Tle3)³⁴, but due to the diversity of T6SS effectors^{35,36} others remain to be identified.

Most data so far have been obtained with hvKp isolates, and the prevalence and function of T6SS in classical *K. pneumoniae* (cKp) strains have not been fully investigated despite the strains being capable of colonizing the intestinal tract. In this study, an in silico approach was used to investigate the prevalence of T6SS and its effectors among documented *Klebsiella* database. The cKp CH1157 strain was used to investigate the toxic effect of Tle1 in vitro using site-directed *Escherichia coli* toxicity assays. In addition, intestinal colonization assays were performed in a murine model to assess the role of T6SS-1 in colonization kinetics of the intestinal tract and its impact on intestinal microbiota composition via 16S rRNA high-throughput sequencing.

Results

Prevalence of T6SS clusters among *Klebsiella* genus and genome organization of T6SS islands in CH1157 strain. The prevalence of T6SS in *Klebsiella* genomes was assessed using MacSyFinder³⁷ and custom-made T6SS models³⁸ within 423 complete genomes of the *Klebsiella* genus of which 339 belonged to *K. pneumoniae* and 22 to *K. variicola* (Supplementary Table S1a). Both *K. pneumoniae* and *K. variicola* had a high prevalence of T6SS clusters, with 98% (332 out of 339) and 95% (20 out of 21) of the strains harboring at least one T6SS, respectively (Fig. 1a). T6SS was present in a remarkably low proportion of *K. quasi subsp. similipneumoniae* representatives (2 out of 14). To further investigate this distribution, we downloaded 45 other complete genomes of *K. quasi subsp. similipneumoniae* (Supplementary Table S1b). Their inclusion did not significantly alter the results, with a global prevalence of 0.2 (in 12 out of the 59 analysed). On average, 1.99 T6SS clusters per genome were found, ranging from 0 to 4 across genomes considering the presence of at least 8 different clustered proteins among TssA, TssB, TssC, TssD (Hcp), TssE, TssF, TssG, TssH (ClpV), TssI (VgrG), TssJ, TssK, TssL, TssM and EvpJ (PAAR) (Fig. 1b, Supplementary Fig. S1). Decreasing the number of proteins required for T6SS systems to be considered complete increased the number of T6SS clusters in genomes that already had a complete T6SS (Supplementary Fig. S2b and c). Accordingly, genomes without a full system (by considering 8 core proteins) did not harbor incomplete T6SS operons (Supplementary Fig. S2b and c).

No significant association was found between the presence of *rmpA* (a capsule regulator involved in hyper-mucoid phenotype and a proxy of hypervirulence) and the number of T6SS clusters in a genome (Kruskal–Wallis Test, $P = 0.7$) (Supplementary Table S1a). Similarly, no association was observed between the number of T6SS clusters and the virulence score of *Klebsiella* (Spearman's test, $P = 0.7$) (Supplementary Table S1a). Using a smaller database (KL65) representative of the diversity of *Klebsiella* and curated for strain origin (see methods) evidenced no significant association between the origin of the strain and the prevalence of T6SS (Fisher's Exact Test, $P = 0.13$) (Fig. 1b).

In the laboratory model strain CH1157, two T6SS-apparented pathogenicity islands were detected, hereafter referred to as T6SS-1 and -2 (27 and 21 kb, respectively). T6SS-1 is closely related to T6SS-1 of reference hypervirulent NTUH-K2044 strain owing their genomic organization and the synteny between the two T6SS core gene loci (Fig. 1c). In contrast, the regions between *vgrG* and *tssM* (corresponding to the toxin-antitoxin system) are highly specific to each strain and likely possess specific T6SS dependent effector encoding genes. T6SS-1 of strain CH1157 encompasses a potentially phospholipase encoding gene (*tle1*) comprising a DUF2235 domain and its cognate three antitoxin genes named *tli1* whereas NTUH-K2044 possesses a LysM gene with a peptidoglycan binding domain and an MltD gene (murein lytic transglycosylase). In the KL65 database, the presence of Tle1 phospholipase toxic effector seems to be specific to the *K. pneumoniae* species complex, since it was detected only in 18 *K. pneumoniae* strains, 2 *K. variicola* strains (342 and At-22) and 1 *K. quasivariicola* (Fig. 1b).

The CH1157 T6SS-2 cluster differs slightly from T6SS-1, having fewer core genes (*tssBC*, *hcp*, PAAR, *clpV* missing) and a different cluster organization. However, synteny was observed between T6SS-2 locus and the second T6SS cluster of *K. variicola* 342 (Fig. 1c). The effector in CH1157 T6SS-2 was different from that of T6SS-1 and potentially encodes an endopeptidase M23-like protein. This hypothetical protein comprises an N-Terminal LysM peptidoglycan binding domain (PF 01476.23), a SLT transglycosylase domain (PF 01464.23), and a C-Terminal M23 peptidase family (PF 01551.25). The prevalence of such a M23-like protein was investigated in silico in 13514 complete genomes from 4232 different bacterial species (Supplementary Fig. S3). The presence of this protein seems to be exclusive to *Klebsiella* genus and *K. pneumoniae* species and was thus named “Tke” (Type VI *Klebsiella* Effector) following the nomenclature of T6SS bacterial effectors (Fig. 1b). No cognate immunity protein was identified.

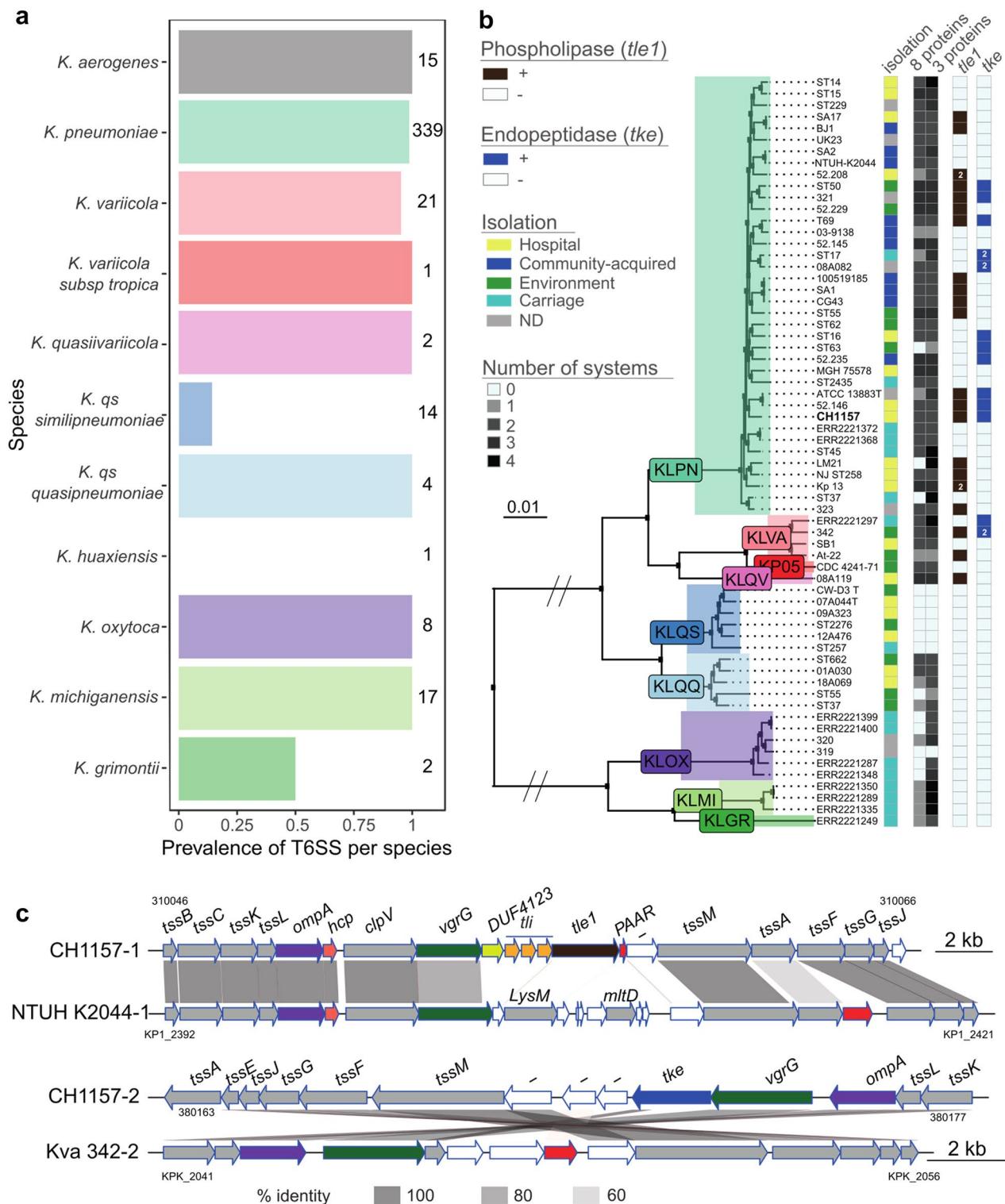


Figure 1. Distribution and characterization of Type VI secretion systems across the *Klebsiella* genus. (a) Prevalence of T6SS is calculated as the ratio of genomes of each species with at least one complete T6SS. Numbers represent the total number of genomes analyzed per species. (b) Unrooted tree built using 2969 families of the persistent genome of the representative strains of *Klebsiella* genus. The first column determines the environment from which the strains were isolated (ND not determined). The second and third columns report the number of T6SS per strain using a minimum number of 3 or 8 proteins, respectively, to consider the presence of a T6SS cluster. The last two columns indicate the presence or absence of phospholipase-encoding and endopeptidase-encoding genes (with at least 80% and 50% identity to that found in T6SSs clusters, respectively). The tree was built using the packages *ggtree* and *treeio* for R. KLPN : *K. pneumoniae*; KLVA : *K. variicola*; KP05 : *K. pneumoniae* 05; KLQQ : *K. quasivariicola*; KLQS : *K. qs similipneumoniae*; KLQQ : *K. qs quasipneumoniae*; KLOX : *K. oxytoca*; KLMI : *K. michiganensis*; KLGR : *K. grimontii* (c) Diagram of the two clusters of CH1157 strain, one of strain NTUH-K2044 and another of *K. variicola* 342. White arrows indicate unknown function, and gray arrows indicate genes that are core to the T6SS. The diagram was built with the *genoplotR* package⁶⁴. The identity percentages were calculated using blastp (v BLAST 2.7.1+, default parameters).

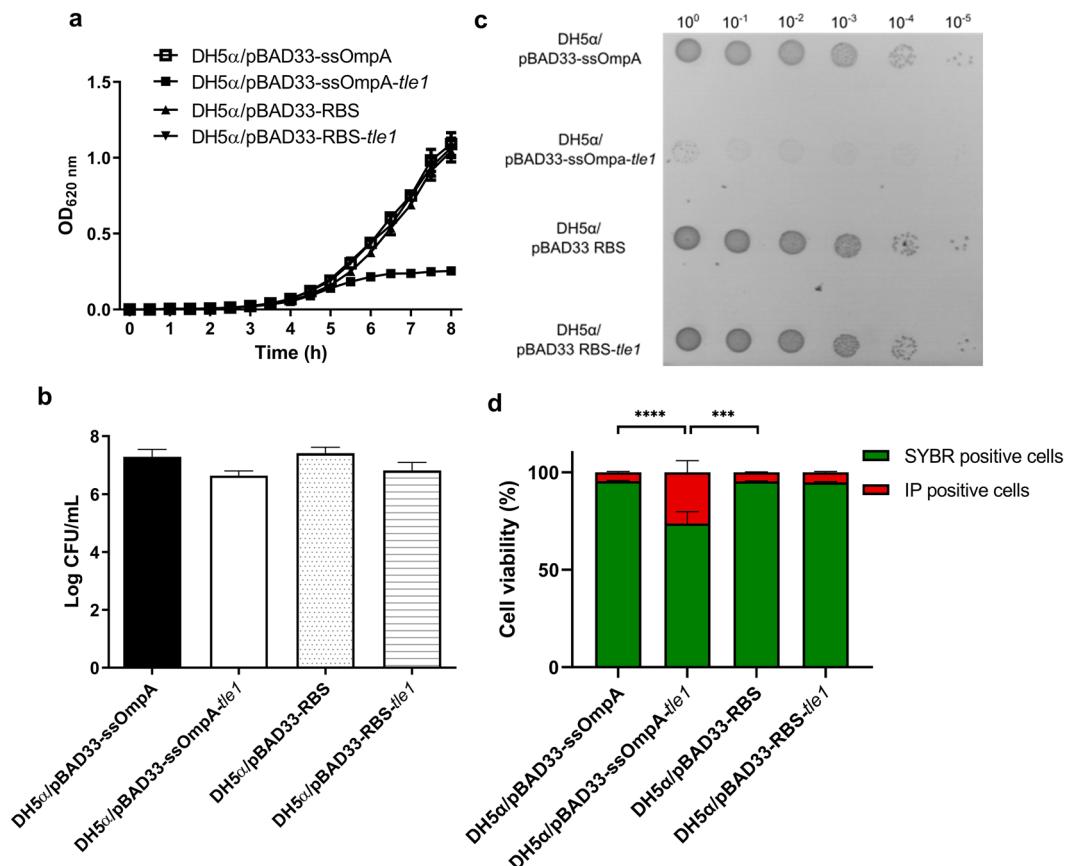


Figure 2. Characterization of Tle1 phospholipase of T6SS-I of CH1476. **(a)** Growth curves of *E. coli* DH5 α harboring pBAD33 derived constructions. **(b)** CFU counts at 8 h of culture of *E. coli* DH5 α strains carrying pBAD33-derived constructions. **(c)** Toxicity assays performed on 0.2% arabinose-containing LB agar plates. Pictures are representative of three independent experiments. **(d)** SYBR/IP stained-cells ratio of *E. coli* DH5 α strains carrying pBAD33-derived constructions. Data are expressed as means \pm SEM ($N = 9$). *P*-values were derived from comparisons of each strain carrying pBAD33 with *tle1* gene copy with cognate native pBAD33 plasmid or between *tle1* containing pBAD33-ssOmpA and pBAD33-RBS strains via nonparametric Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparison test: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.005, *****P* < 0.001.

Membrane permeability associated with periplasmic expression of Tle1 phospholipase. The Tle1 effector antibacterial effect has been previously reported³⁰. To assess if this phenotype was associated with the effector of strain CH1157, heterologous expression of Tle1 in *E. coli* DH5 α was performed. Addressing of Tle1 specifically to the periplasm significantly affected bacterial growth, as evidenced by spectrometric measurement of the growth of *E. coli* DH5 α /pBAD33-ssOmpA-tle1 compared to that of the control strain (*E. coli* DH5 α /pBAD33-ssOmpA) (Fig. 2a). In contrast, cytoplasmic addressing of Tle1 (*E. coli* DH5 α recombinant strain harboring pBAD33-RBS-tle1) did not affect bacterial growth compared to that of the control strain (*E. coli* DH5 α /pBAD33-RBS). Determination of the number of viable cells at the final point (8 h) did not show any significant differences between the four strains (Fig. 2b) but an unusual microcolony phenotype was associated with periplasmic addressing of Tle1 (Fig. 2c). Flow cytometry analysis after SYBR Green and propidium iodide (IP) staining showed that when Tle1 was located in the periplasm it significantly enhanced cell membrane permeability compared to Tle1 in the cytoplasm and DH5 α control strains (DH5 α /pBAD33-ssOmpA and DH5 α /pBAD33-RBS) (Fig. 2d).

***K. pneumoniae* T6SS-1 is involved in mice intestinal colonization.** In absence of streptomycin treatment, the colonization of the gut by *K. pneumoniae* CH1476 (a fully virulent CH1157-derived strain³⁹ (see Material and Methods)) could not be followed in feces due to its very low implantation until 10 days post-infection ($5.21 \cdot 10^2 \pm 2.17 \cdot 10^2$ CFU/g of feces; detection threshold: 10^2 CFU/g of feces). In the streptomycin-treated murine model, whatever the strain tested (CH1476 wild-type harboring the empty vector, the isogenic mutant CH1476- Δ tssB/pSTAB or the trans-complemented strain CH1476- Δ tssB/pSTAB-tssB) (Fig. 3a), a peak of colonization level was reached after 7 days of infection (10^9 UFC/g of feces), followed by stable colonization kinetics until 54 days post-infection (Fig. 3b).

CH1476- Δ tssB/pSTAB mutant strain then became undetectable in the stool 61 days post-infection while the CH1476- Δ tssB/pSTAB-tssB trans-complemented and CH1476/pSTAB WT strains remained detectable until 96

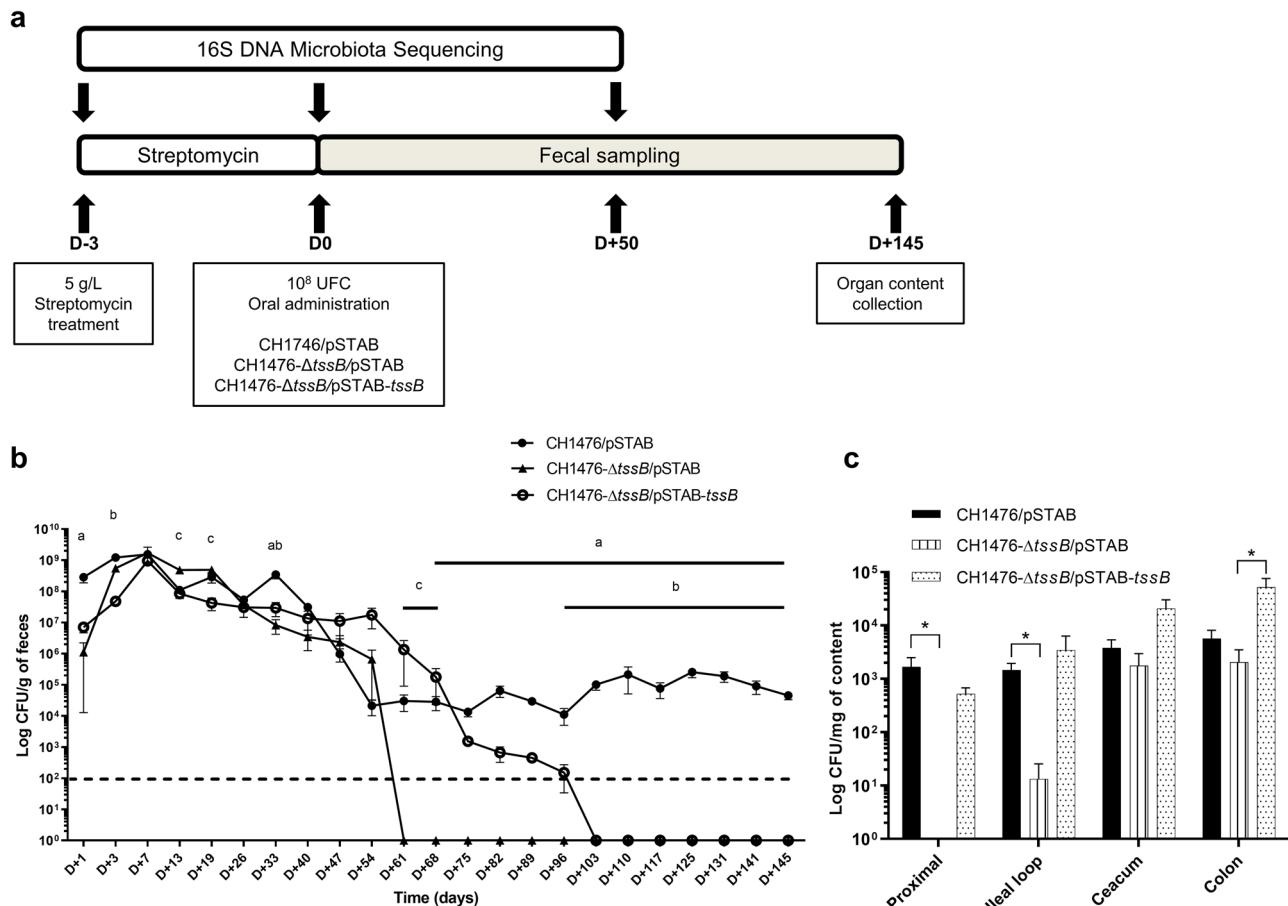


Figure 3. Role of T6SS-1 in gastrointestinal colonization of mice by *K. pneumoniae* CH1476. (a) Experimental procedure ($n=6$ /group). (b) After 72 h of streptomycin treatment (5 g/L in drinking water), mice were intragastrically inoculated with 1×10^8 CFU of *K. pneumoniae* CH1476 strain (CH1476/pSTAB, full circle), CH1476- $\Delta tssB$ isogenic mutant (CH1476- $\Delta tssB$ /pSTAB, full triangle) or the trans-complemented control strain (CH1476- $\Delta tssB$ /pSTAB-tssB, empty circle). Results are expressed as means *K. pneumoniae* CFU/g of feces \pm SEM over 145 days; the dashed line indicates the limit of detection (10^2 CFU). Statistical analysis: nonparametric Kruskall-Wallis with Dunn's multiple comparison test: a, b, c: $p < 0.05$, respectively CH1476/pSTAB vs CH1476- $\Delta tssB$ /pSTAB, CH1476/pSTAB vs CH1476- $\Delta tssB$ /pSTAB-tssB and CH1476- $\Delta tssB$ /pSTAB vs CH1476- $\Delta tssB$ /pSTAB-tssB. (c) Representation along the gastrointestinal tract of *K. pneumoniae* CH1476/pSTAB (black bar), CH1476- $\Delta tssB$ /pSTAB isogenic mutant (full line bar) or the CH1476- $\Delta tssB$ /pSTAB-tssB trans-complemented control strain (dotted line bar) in CFU/g of content in mice. Data are expressed as means of each 6 values \pm SEM. Statistical analysis: nonparametric Kruskall-Wallis with Dunn's multiple comparison test: * $P < 0.05$.

and 145 days post-infection, respectively. Analysis of the intestinal content of the three sets of mice on day 145 post-infection showed that CH1476- $\Delta tssB$ /pSTAB was mainly present in the lower part of the gastrointestinal tract, whereas the CH1476/pSTAB WT and the trans-complemented strains were detected at similar levels in the proximal intestine and the colon (between 10^3 and 10^4 CFU/g of content) (Fig. 3c). Similar results were obtained with the CH1476- $\Delta clpV$ mutant, which is deficient in T6SS recycling. CH1476- $\Delta clpV$ strain colonization levels were significantly lower than those of the CH1476 parental strain 80 days after infection ($3.1 \cdot 10^4$ CFU/g of feces vs $8.5 \cdot 10^6$ CFU/g of feces respectively). In addition, analysis of intestinal contents showed that colonization levels of CH1476- $\Delta clpV$ were significantly lower all along the intestinal tract than those of the CH1476 parental strain (Supplementary Fig. S4).

Influence of T6SS-1 on the richness and diversity of intestinal microbiota in a streptomycin-treated mice model. Overall microbiota diversity was greatly affected by initial streptomycin treatment in every animal group, as shown by the decrease in α -diversity indexes (Observed and Shannon) between D-3 and D0 (Fig. 4a and b). Principal coordinate analysis (PCoA) of unweighted UniFrac non-metric multidimensional scaling (NMDS) (β -diversity) showed that the microbial composition of mice microbiota was clearly impacted due to the streptomycin treatment (D-3 versus D0) (Fig. 4c). Some bacterial families were not affected by streptomycin administration (Porphyromonadaceae, Bifidobacteriaceae, Atopobiaceae, Rikenellaceae) while some others were significantly depleted (Bacteroidales, Prevotellaceae, Coriobacteriaceae, Oscillospiraceae, Defluvitaleaceae, Clostridiaceae, Anaerovoraceae, Rhodospirillaceae, Desulfovibrionaceae, Deferrribacteraceae, Alcaligenaceae) (Fig. 4d; Supplementary Fig. S6b).

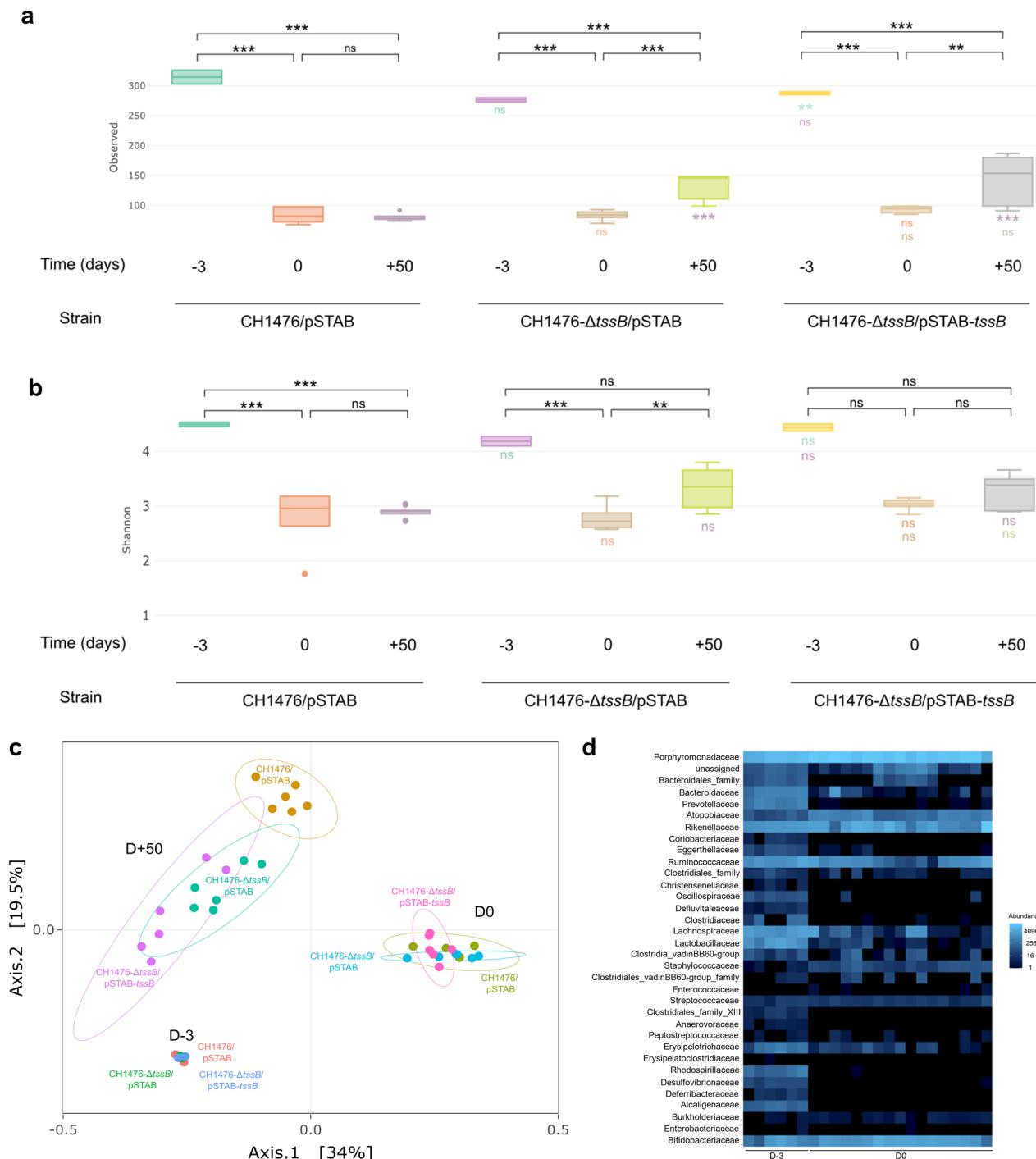


Figure 4. Modulation of gut microbiome of *K. pneumoniae*-infected mice correlated with the presence of T6SS-1. Alpha diversity richness: Observed index (a) and Shannon index (b) based on 16S rRNA genes from CH1476 (CH1476/pSTAB), T6SS-1 derived mutant (CH1476- Δ tssB/pSTAB) and T6SS-1 derived mutant trans-complemented (CH1476- Δ tssB/pSTAB-tssB) infected mice. Data are expressed as median \pm minimum and maximum values. (c) Principal-coordinates analysis plot (PCoA) of the gut microbiota based on the results of the unweighted UniFrac non-metric multidimensional scaling (NMDS). Each point represents a mouse. (d) Clustering heatmap of family raw abundances in fecal microbiota of mice before (D-3) and after streptomycin treatment (D0). Blue denotes increased abundance, and black denotes decreased abundance. Statistical analysis: one-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and 'ns' indicates that the difference is not significant; a color code indicates differences between mice groups at the same time point.

In animals receiving the *K. pneumoniae* wild-type strain (CH1476/pSTAB), the diversity of the microbiota remained low even after 50 days, whereas in animals receiving the mutant strain (CH1476- $\Delta tssB$ /pSTAB) diversity increased (Fig. 4a and b). Diversity was only partially restored in mice receiving the trans-complemented strain (CH1476- $\Delta tssB$ /pSTAB- $tssB$) (Fig. 4a and b). At D+50, the β -diversity of each group of mice (receiving CH1476/pSTAB, CH1476- $\Delta tssB$ /pSTAB and CH1476- $\Delta tssB$ /pSTAB- $tssB$) was reflected in different clusters (Fig. 4c), indicating a significant effect of the cKp T6SS-1, which is likely the system responsible for delivering Tle1, on the resilience of the intestinal microbiota. Similar results were obtained with the CH1476- $\Delta clpV$ mutant compared to the CH1476 WT strain in in vivo assays (Supplementary Fig. S5).

Further analysis of the composition of the microbiota members in each group of mice by 16S sequencing of animal fecal content indicated that Clostridiales, Enterobacteriaceae and Rhodospirillaceae were present at both D-3 and D+50 in mice infected with the CH1476/pSTAB WT strain (Fig. 5a,c, and d). In the group of mice infected by CH1476- $\Delta tssB$ /pSTAB- $tssB$, Alcaligenaceae, Clostridiales and Anaerovoraceae families were found at both D-3 and D+50 (Fig. 5c and d; Supplementary Fig. S6a). In the group of mice infected by the CH1476- $\Delta tssB$ /pSTAB strain, Oscillospiraceae and Alcaligenaceae families were found at D-3 and D+50 (Fig. 5b, c and d). In mice infected with the CH1476- $\Delta clpV$ mutant, Oscillospiraceae were also found at D+50 (Supplementary Fig. S7). These results suggest that Oscillospiraceae could be a potential target of T6SS of *K. pneumoniae*. Additionally, enriched and depleted families in each group were analyzed at D+50 post-infection. A 6 and 12.1-fold increase was found at D+50 in the Oscillospiraceae family in mice groups receiving, respectively, CH1476- $\Delta clpV$ or CH1476- $\Delta tssB$ /pSTAB mutant in comparison to their respective control WT group (Fig. 5e; Supplementary Fig. S7f). Clostridiaceae was also over-represented in the two groups of mice receiving the mutant strains at D+50 in comparison with their respective WT groups (13 and 2.47-fold increase, respectively).

Discussion

In agreement with previously published data^{28,29,33,36,40}, in silico analysis detected T6SS-related genes in both hypervirulent and non-hypervirulent *K. pneumoniae* strains and in other *Klebsiella* species irrespective of the strains' virulence and their origin of isolation. The T6SS prevalence ranged from 98% in *K. pneumoniae* species to 14% in *K. quasipneumoniae similpneumoniae*, suggesting that a strong counter selection had occurred in this subspecies, which includes mostly lower virulent strains with less extensive antibiotic resistance⁴¹. Two T6SS-appended clusters, T6SS-1 and T6SS-2, were identified in the genome of the classical *K. pneumoniae* CH1157 strain. The cluster organization of T6SS-1 presents a synteny with that of T6SS-1 of the hypervirulent strain NTUH-K2044⁴². A toxin-antitoxin system was also identified in the T6SS-1 cluster composed of a type VI lipase effector 1 encoding gene (*tle1*). In accordance with the classification proposed by Li et al., a DUF2235 domain is present in the protein sequence encoded by the *tle1* gene, its specific function is not known. The presence of such a domain in CH1157 Tle1, allows its affiliation into the 4th effector group³⁶. Although 80% of ST11 isolates of *K. pneumoniae* belong to this group, this is not the case for the ST2 isolate CH1157 strain. As previously mentioned, three *tli1* encoding genes, which could serve as Tle1 immunity proteins, were found upstream *tle1* in T6SS-1 cluster³⁶. Tle1 phospholipase recruitment requires a DUF4123 adaptor to be fixed on the tip of the T6SS syringe before delivery. This effector chaperone is located upstream of the toxin-antitoxin system and has been found in other T6SS operons^{43,44}. The presence of this potential lipase effector Tle1 was detected in 57% of *K. pneumoniae* isolates, a proportion consistent with that of previous published data obtained with Gram-negative species (*Burkholderia thailandensis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. enterica*, *Acinetobacter baumanii*)³⁴. The CH1157 *tle1* gene has a 92% nucleotide identity coverage compared with the *tle1* sequence previously described in the multidrug-resistant *K. pneumoniae* strain HS11286³⁰.

The role of T6SS in *K. pneumoniae* species has been so far studied mainly in hypervirulent strains^{30–32,42}. We aimed to identify the potential antibacterial effect of *K. pneumoniae* CH1157 Tle1. As reported in another non-hypervirulent but multi-drug resistant strain, HS11286, the Tle1 effector of *K. pneumoniae* CH1157 strain could exert an antibacterial effect³⁰. This toxic effect was first assessed by in vitro competition assays in i) an interspecies manner, by co-cultivating a CH1157 attacker strain and a variety of Gram-negative potential prey strains representative of those found in mice microbiota (*E. coli*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides fragilis*, *Parabacteroides distasonis*) and ii) in an intraspecies manner, by co-cultivating a CH1157 attacker strain and its T6SS-derived mutant strains impaired either for T6SS core gene synthesis (CH1476- $\Delta tssB$) or for toxin-antitoxin system production (CH1476- ΔTA), respectively (data not shown). No antibacterial effect was observed in the tested conditions. A different genetic background between the cKp CH1157 and the MDR HS11286 strains could also explain the difference in the in vitro effect of Tle1. In vivo, different stressors could induce expression of T6SS and/or facilitate Tle1 activity as was observed for other Enterobacteriaceae⁴⁵. Moreover, to understand the role of this effector in a heterologous system, the *tle1* gene was cloned into pBAD33 plasmids to directly produce it either in periplasmic or in cytoplasmic compartments of *E. coli* DH5 α cells. Tle1 periplasmic production in *E. coli* DH5 α strain did not induce cell lysis but impaired membrane permeability as measured by IP staining, and gave rise to a small colony phenotype. Similarly, Liu et al. demonstrated the antibacterial effect of HS11286 Tle1 phospholipase in an analogous system of periplasmic production of this effector in BL21 *E. coli* cells³⁰. T6SS expression in the carbapenem-resistant HS11286 strain is upregulated in the presence of β -lactam antibiotics³⁰. The authors performed *E. coli* toxicity assays in presence of 50 μ g/mL of ampicillin, which upregulates T6SS expression and could, in synergy with Tle1, enhance membrane permeability and thereby lead to efficient cell toxicity. The T6SS-2 cluster found in CH1157 slightly differ from the T6SS-1 since it does not encode essential T6SS core components (TssBC, Hcp). As investigated by Storey et al., there is a great diversity in T6SS cluster organization in *K. pneumoniae* genomes⁴⁶. Other *K. pneumoniae* genomes also possess incomplete T6SS clusters, whose role remains to be defined⁴⁰. The independent functioning of truncated T6SS clusters is still questionable: their activity could be dependent of the simultaneous presence of a complete cluster as already described

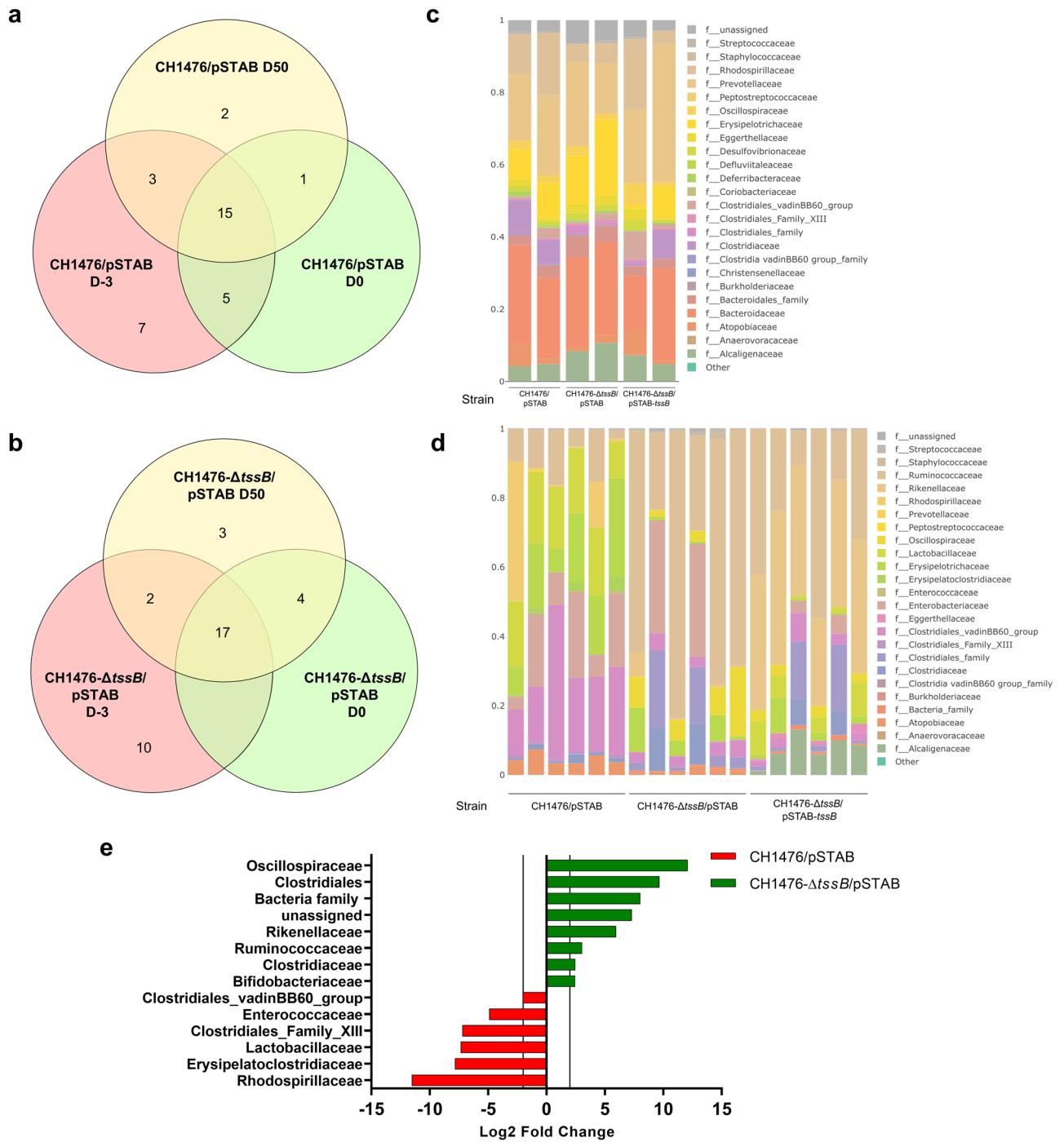


Figure 5. Modulation of composition of mice intestinal microbiota linked to the presence of *K. pneumoniae* and role of T6SS-1. Venn diagrams for number of bacterial families in fecal microbiota shared among the different infected groups of mice: (a) WT CH1476 (CH1476/pSTAB) and (b) T6SS-1 derived mutant (CH1476- Δ tssB/pSTAB) at different time points. Community composition plot for relative abundance of bacterial families in fecal microbiota at (c). D-3 and (d) D+50 infection time points in the different infected groups of mice. Each bar represents a single mouse. (e) Differential analysis showing families' relative abundance between WT CH1476 (red) and T6SS-1 derived mutant (green) at D+50 PI. The dashed line indicates the limit of detection (-2 or $+2$ Log₂ Fold Change).

for orphan genes³⁸. The CH1157 T6SS-2 possesses an endopeptidase-encoding gene (Fig. 1c) and its putative protein (Tke) contains a N-terminal LysM peptidoglycan binding domain and a M23 putative catalytic site in the C-terminal part. No cognate immune protein was identified around the Tke potential effector, likely due to the

lack of data in the immune protein database³⁶. Bioinformatic analyses have shown that CH1157 Tke are mainly found in *K. pneumoniae* species and share specific domains of other T6SSs effectors (Type VI Amidase Effector (Tae) and Type VI Metallopeptidase Effector (Tpe))⁴⁷. Moreover, an SLT transglycosylase domain (PF 01464.23) previously identified in Tke was shown to belong to Lyz-like superfamily (cl00222) and to share domains with 11th effector group in *K. pneumoniae* described by Li et al.³⁶. T6SS targeted cells could therefore be affected in their capacity to survive in a competitive and stressful environment such as the intestinal tract.

Our results showed that T6SS-1 facilitates long-term establishment of *K. pneumoniae* CH1476 in the gastrointestinal tract of animals previously treated with streptomycin. Analyses of microbiota α-diversity of mice feces harvested both pre- and post-treatment (D0 versus D-3) show that streptomycin affects microbiota richness, with a decrease in facultative anaerobes (especially *Bacteroides* genus) (Fig. 4d) as previously reported⁴⁸. The results obtained with this animal model correlate with the long-term gastrointestinal carriage of *K. pneumoniae* in patients treated with antibiotics, indicating that intestinal microbiota dysbiosis promotes *K. pneumoniae* implantation⁷. T6SS has been previously shown to contribute to the overall fitness of hvKp in vivo, and its importance in gastrointestinal colonization and translocation was reported in a murine model with strain NTUH-K2044 a short time point after challenge (2 and 6 days post-infection)⁴². Lethal effects associated with the expression of T6SS were also reported with the hvKp 52.145 strain in a *G. mellonella* larvae infection model⁴⁶ and a murine pulmonary infection model²⁹. In the latter study, trans-complementation of the isogenic *Δpld1* mutant, deficient for the synthesis of the phospholipase effector, only partially restored the lethality phenotype. Similarly, trans-complementation of the *tssB* gene in our study partially restored the lack of colonization in mice, probably due to stoichiometry modifications of the molecular compounds necessary for T6SS machinery establishment.

T6SS-1 is necessary for the colonization of the uppermost part of the intestinal tract of mice i.e. the proximal intestine and ileal loop. Major differences in microbiota composition along the mice gastrointestinal tract could explain the disparities in colonization linked to the presence of potential *K. pneumoniae* competitors: Lactobacillaceae are predominant in the oxygen-rich small intestine, and strictly anaerobic Bacteroidaceae and Lachnospiraceae are enriched in the large intestine and fecal content of mice⁴⁹. The role of *K. pneumoniae* T6SS within the upper GIT microbiota remains to be unraveled. Colonization gradient of *K. pneumoniae* along the intestinal tract of mice is correlated with differences in concentrations of T6SS-triggering molecules, as the concentration peak of bile salts is observed in the proximal ileum and progressively decreases distally⁵⁰. In vitro, the influence of intestinal parameters on T6SS expression has already been described with intestinal pathogens: the *V. cholerae* T6SS is activated by mucins and microbiota-modified bile salt⁵¹, the *S. Typhimurium* T6SS is activated by bile salts²⁶, and the enteroaggregative *E. coli* Sci-1 T6SS is responsive to iron starvation⁵². In hvKp, other environmental factors such as presence of anti-microbial peptides (HBD-3), high osmotic pressure and pH variations influence the expression of T6SS-encoding genes^{30,42,46}. More recently, overexpression of two different clusters of T6SS in *K. pneumoniae* ST258 was correlated, in vitro and in vivo, with an excess of oxidant stress such as encountered during airway infection suggesting a role of T6SS in pulmonary pathogenesis³³.

Antibacterial activity of T6SS is involved in bacterial warfare, even in complex environments such as plants, insects, and the gut microbiota of mammals⁵³. The study of interactions between commensal microbes and gastrointestinal pathogens is a growing field, and in vivo T6SS-mediated bacterial competition has already been observed in *Salmonella enterica* Typhimurium, *Burkholderia thailandensis*, *E. coli* (EHEC), *Shigella sonnei*, *Bacteroides fragilis* and *Vibrio cholerae*⁵⁴. However, it is clearly advised that long-term experiments should understand the real contribution of antibacterial weapons in shaping microbial communities⁵⁴. In our study, we showed that T6SS-1 was required for intestinal persistence of cKp, suggesting that this system mediates antagonistic bacterial interactions that impair microbiota resilience. Indeed, at day 50 after infection, when the WT strain and T6SS-1 mutant were still present in equal amounts in the feces of mice, the composition of microbiota in the different groups of infection was heterogeneous. There was a higher resilience of microbiota in the CH1476-*ΔtssB*/pSTAB group of co-housing mice than in the two other groups, suggesting that T6SS affects the ability of the microbiota to refill itself after breakdown. The Oscillospiraceae family was significantly increased in absence of *K. pneumoniae* T6SS-1 and could thus be a potential target of T6SS since this family is present in the intestinal microbiota of mice infected with CH1476-*ΔtssB*/pSTAB at both D-3 and D+50 (Fig. 5b). As previously suggested, T6SS effectors could mediate the specific elimination of metabolic competitors⁵⁴, thus facilitating the colonization process. For instance, *Vibrio fischeri* specifically targets competitors via TasL lipoprotein cell-cell attachment⁵⁵. An impact of T6SS-1 effectors on eukaryotic cells cannot be totally excluded, although no Tle1 direct effect on host cells has yet been reported. However, in *P. aeruginosa*, other Tle phospholipases (PldA / Tle5A, PldB / Tle5B and TplE / Tle4) have been shown as capable of targeting eukaryotic cells (activating PI3K/Akt pathway and promoting autophagy, respectively)^{21,35}.

Our approach allowed a better understanding of bacterial interactions in gut microbiota mediated by the T6SS-1 of cKp. There is a clear knowledge gap in understanding the T6SS function in the context of the holobiont and more research in this area is necessary, especially considering the diversity of T6SS effectors and the activities that may have. Indeed, the effect on other microbiota members (fungi) and host cells²¹ remains to be investigated⁴⁶. T6SS eukaryotic-targeting effectors could enhance pathogen virulence by modulating host epithelial cell integrity or protecting themselves from innate immune response⁵⁶. Overcoming colonization resistance by T6SS related to modulation of host response during infection, making T6SS an efficient virulence factor for pathogens²⁵. Improved mechanistic understanding of commensal-pathogen interactions is a fundamental prerequisite for the design of prophylactic and therapeutic approaches for *Klebsiella* control, especially for multidrug resistant strains.

Materials and methods

Identification of T6SS clusters in *Klebsiella* genus. The list of genomes used in this study is presented in Supplementary Table S1a. (i) KL427 database. All fully sequenced *Klebsiella* genomes from NCBI RefSeq were downloaded and analyzed (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/>, accessed in April 2019). Species assignation was corrected using Kleborate and virulence score assignation according to the presence of well-described virulence factors⁵⁷. The species was assigned with a strong level of confidence for 414 genomes, and considered weak for 10 (Supplementary Fig. S2a). Three strains were discarded due to wrongful genus assignation. Additional *K. quasipneumoniae* subsp *similpneumoniae* genomes were downloaded from NCBI on July 6th 2022 (Supplementary Table S1b), and verified with Kleborate for correct species assignation. (ii) KL65 database. This database reflects *Klebsiella* diversity in terms of species and STs and was manually curated based on the availability of reliable isolation data.

Identification of T6SS systems. MacSyFinder³⁷, an open-source software that detects macromolecular systems, was used to identify T6SS systems in *Klebsiella* genomes. As input, it requires: (i) a proteome, (ii) a set of Hidden Markov Model (HMM) protein profiles, and (iii) a model describing the number of genetic components and their organization. (i) *Definition of HMM profiles*. The HMM protein profiles have been described elsewhere³⁸. Profiles for TssA, TssB, TssC, TssD (Hcp), TssE, TssF, TssG, TssH (ClpV), TssI (VgrG), TssJ, TssK, TssL, TssM and EvpJ, were used. (ii) *Model*. To identify *bona fide* T6SS, in *Klebsiella* genomes, the model corresponding to T6SSi was applied³⁸, which sequentially requires 3 to 13 minimum mandatory proteins (biologically essential components for a putative functional system), associated with the T6SS. The different cluster organizations as well as their respective prevalence are presented in Supplementary Fig. S1. The different models gave qualitatively very similar results (Supplementary Fig. S2b). Decreasing the number of proteins required for a system to be considered complete resulted in an increase in secondary T6SS loci but had little effect on the number of genomes coding at least one T6SS (Supplementary Fig. S2c). The presence of at least 8 different core proteins was considered for the estimation of the prevalence of T6SS clusters, as it is the greatest number of necessary core proteins required to detect at least 2 T6SS in *Klebsiella* strains without inducing false negative results (Supplementary Figs. S2b and c). Additionally, components should be encoded in a single locus and the maximum distance between consecutive elements limited to 20 proteins. Models were written in plain text using a specific XML grammar and can be modified by the user (see <http://macsyfinder.readthedocs.io/en/latest/> for details). (iii) *Identification of effectors*. BLASTP (v BLAST 2.7.1+, default parameters) were performed to identify homologous Tle1-like proteins in genomes of KL65 database to Tle1 protein encoded in the first T6SS locus of CH1157. At least 80% of protein identity was required to consider Tle1-like presence. Similarly, the presence of Tke-like proteins was evaluated by BLASTP (v BLAST 2.7.1+, default parameters) using the sequence of the endopeptidase of CH1157 as query against the RefSeq database (April 2019). The latter comprises a total of 14,363 chromosomes and 11,806 plasmids, representing 13,514 complete genomes from 4232 bacterial species. At least 50% identity and a coverage of over 60% of the protein length (> 400) was required to consider Tke-like presence.

Klebsiella phylogeny (KL65 database). (i) *Identification of the persistent genome*. To build the phylogeny, we first identified the persistent genome using PanACoTA⁵⁸. The pan genome was inferred with the connected-component clustering algorithm of MMSeqs2 with pairwise bidirectional coverage > 0.8 and sequence identity > 0.8. The persistent genome was built from the pangenome, with a persistence threshold of 95%, meaning that a gene family had to be present in a single copy in at least 62 out of the 65 genomes to be considered persistent. Of the 22,288 gene families of the *Klebsiella* pangenome, 2969 were present in 95% of the genomes.

(ii) *Construction of the phylogenetic tree*. To compute the phylogenetic tree, families of the persistent genome were individually aligned with mafft (v7.407) (PMID: 23329690) from the protein sequences back-translated to DNA. The maximum likelihood tree was built using the nucleotide alignment of the persistent genome with IQ-TREE multicore (v2.1.2) under the GTR model with a total of 651,381 informative sites⁵⁹. Information on strain collection regarding strains isolated from the hospital, community-acquired infections, the environment or carriage strains was reliable.

Bacterial strains, plasmids and culture conditions. Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. CH1476 corresponds to CH1157 strain deleted for ampicillin *shv-1* B-lactamase resistance gene and replaced by *aadA7* gene conferring streptomycin resistance to allow molecular biology and in vivo experiments³⁹. Derived mutant strains (T6SS mutants) were constructed as described elsewhere using the Datsenko & Wanner method⁶⁰. Unless otherwise indicated, bacteria were grown in lysogeny broth (LB) medium in glass tubes at 37 °C in a shaker (200 rpm), or on LB agar plates overnight at 37 °C. When required, antibiotics in media were added at the following concentrations: streptomycin (50 µg/mL), ampicillin (100 µg/mL), kanamycin (50 µg/mL), tetracycline (35 µg/mL), spectinomycin (50 µg/mL), chloramphenicol (35 µg/mL).

For trans-complementation assays, DNA fragments containing the entire *tssB* gene were amplified from *K. pneumoniae* CH1476 genomic DNA by an overlapping extension PCR using primers listed in Supplementary Table S2 (Ins-*tssB*-pSTAB-Fw and Ins-*tssB*-pSTAB-Rv). The resulting fragment was cloned into the linearized stable plasmid pSTAB⁶¹ previously amplified with the primers Lin-pSTAB-*tssB*-Fw and Lin-pSTAB-*tssB*-Rv (Supplementary Table S2) using Gibson Assembly Cloning Kit (NEW ENGLAND BIOLABS; Ipswich, Massachusetts, USA).

Plasmid vectors pBAD33-ssOmpA (periplasmic addressing of the product) and pBAD33-RBS (cytoplasmic addressing of the product) (Table 1) were used in cloning experiments⁶² performed in the *Escherichia coli* DH5α strain. The *tle1* gene was amplified with high fidelity Phusion Taq (THERMOFISHER; Waltham, Massachusetts,

Identification	Description	Source and/or reference
Bacterial strains		
<i>K. pneumoniae</i> CH1157	<i>K. pneumoniae</i> clinical isolate, Ap ^R	39
<i>K. pneumoniae</i> CH1476	CH1157-Δshv1::aadA7, Sp ^R	39
<i>K. pneumoniae</i> CH1476-ΔclpV	clpV mutant strain after Km cassette excision, Sp ^R	This study
<i>K. pneumoniae</i> CH1476-ΔtssB	tssB mutant strain after Km cassette excision, Sp ^R	This study
<i>E. coli</i> DH5α	F-, Δ(argF-lac) U169, phoA, supE44, Δ(lacZ)M15, relA, endA, thi, hsdR	Laboratory collection
Plasmids		
pKOBEG199	pBAD cloning vector harboring λphage redyβα operon, Cm ^R	65
pKD4	Plasmid with FRT-flanked Km-resistance cassette used for Km cassette amplification, Ap ^R , Km ^R	60
pCP20	Plasmid carrying the yeast recombinase gene (FLP, aka exo), Cm and Ap resistant gene and temperature sensitive replication, Ap ^R	60
pSTAB	pZE derivative plasmid. Contains the flm toxin-antitoxin system from F plasmid, Ap ^R	61
pSTAB-tssB	pSTAB carrying a copy of tssB gene, Ap ^R	This study
pBAD33	Plasmid for cloning, L-arabinose inducible, p15A origin, Cm ^R	66
pBAD33-ssOmpA	pBAD33 with signal peptide periplasmic specific Outer Membrane Protein A sequence inserted before MCS, Cm ^R	Gift from E. Cascales
pBAD33-ssOmpA-tle1	pBAD33-ssOmpA carrying a copy of tle1 gene, Cm ^R	This study
pBAD33-RBS	pBAD33 with ribosome-binding site consensus sequence inserted into MCS, Cm ^R	66
pBAD33-RBS-tle1	pBAD33-RBS carrying a copy of tle1 gene, Cm ^R	This study

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study. Abbreviations Ampicillin (Ap); Spectinomycin (Sp); Kanamycin (Km); Tetracycline (Tet); Chloramphenicol (Cm).

USA) from CH1476 genomic DNA using oligonucleotides (Supplementary Table S2) containing *Sall* and *HindIII* restriction sites within their 5' and 3' ends respectively. The resulting *tle1* amplification product was digested by *Sall* and *HindIII* restriction enzymes and then inserted into both pBAD33 plasmids (pBAD33-ssOmpA-tle1 and pBAD33-RBS-tle1) (Table 1). After electroporation, transformants were selected onto LB agar plates containing 0.8% glucose to inhibit “leaky expression” of the pBAD33 promoter and 35 µg/mL chloramphenicol. All constructions were verified by PCR (GoTaq Colorless Mastermix) (PROMEGA; Charbonnières les Bains, France) and by determination of DNA sequence (EUROFINS GENOMICS; Ebersberg, Germany).

Effect of tle1 expression in *E. coli* DH5α. Measurement of the Tle1 effect was assessed in *E. coli* DH5α pBAD33-derived strains (Table 1) by (i) bacterial growth monitoring and CFU counts, (ii) phenotypical analysis by agar plates spotting, and (iii) flow cytometry analysis after live-dead staining. (i) Briefly, overnight cultures in LB supplemented with 0.8% glucose were diluted to an OD_{620nm} 0.001 in LB medium containing 0.2% arabinose and their growth was monitored for 8 h by OD_{620nm} measurements. At the last time point, serial dilutions of the suspensions were plated onto LB agar supplemented with 0.8% glucose and chloramphenicol for CFU counting; (ii) O/N cultures adjusted to an OD_{620nm} 0.2 were serially diluted, and 10µL of each dilution were spotted onto LB agar containing 0.2% arabinose and chloramphenicol; (iii) Cells from 8-h culture were harvested by centrifugation from batch culture (at 3800G), washed once with saline solution, and diluted 50-fold prior to live/dead staining. A standard nucleic staining protocol combining the cell-permeant fluorochrome SYBR Green I (SGI, THERMOFISHER) and the cell-impermeant Propidium Iodide (PI, SIGMA-ALDRICH; St-Quentin-Fallavier, France) was used to reveal live and dead cells. SGI (10,000 × stock) was added to the sample (1× final concentration) and incubated for 10 min before the addition of PI (10 µg/mL fc) for an additional 5 min, in the dark and at room temperature. Tubes containing stained cells were vortexed for 10 s before acquisition (flow rate 69.2µL/min, and at least 20,000 events collected) with a BD LSR Fortessa X20 flow cytometer (BD BIOSCIENCES; Le Pont de Claix, France). SGI and PI were excited by a 488 nm (50mW) laser and collected through a 530/30BP filter with a preceding 505LP filter for SGI and through a 610/20BP filter with a preceding 600LP filter for PI. Counts were obtained in a bivariate dot plot in which live and dead cell populations were divided according to SYBR emission (on the abscissa axis) and PI emission (on the ordinate axis).

In vivo gastrointestinal colonization assays. Eight-week-old specific pathogen-free C57BL-6 J male mice (CHARLES RIVER; Saint Germain Nuelles, France) were housed six per cage at animal biosafety level 2 (21–22 °C, 12 h/12 h light-dark cycle) with access to food and water ad libitum. All experiments were performed in compliance with ARRIVE guidelines and according to the ethical guidelines set out in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and with approval of the “Comité d’Ethique pour l’Expérimentation Animale Auvergne” (C2E2A), the local ethics committee (Reference number: APAFIS#17520-2019030413278293). After +/− pre-treatment for 72 h with 5 g/L of streptomycin in drinking water, mice received 1 × 10⁸ CFU equivalent doses of *K. pneumoniae* WT and derived strains in 200µL of PBS via the intragastric route. Feces were first collected daily, then weekly, weighed, and homogenized in PBS (500–1000 µL). Serial dilutions were plated onto selective LB agar media with an appropriate antibiotic (ampicillin 100 µg/mL) to evaluate *K. pneumoniae* colonization levels in mouse intestine (Fig. 3a). Results were expressed as Log₁₀ of numbers of CFU/g of feces.

Before antibiotic treatment (D-3), the day of infection (D0) and 50 days after inoculation (D50), feces were also collected and frozen at -80°C until nucleic acid extraction. At the end of the experiment, mice were killed by cervical dislocation in strict accordance with ethical recommendations. The contents of different gastrointestinal tract parts (proximal, ileal loop, caecum, colon) were collected, serially diluted in PBS and plated onto selective LB agar with an appropriate antibiotic (ampicillin 100 $\mu\text{g/mL}$) to assess pathogen distribution throughout the gastrointestinal tract. Results were expressed as Log_{10} of numbers of CFU/mg of content.

DNA extraction from feces and 16S sequencing. DNA was extracted from mice feces with the FastDNA Spin Kit for Soil (MPBIOMEDICALS) according to the manufacturer's instructions. Total nucleic acid extracts were eluted in 50 μL of DES Buffer. DNA content of each sample was assessed with Qubit (THERMOFISHER). Samples were stocked at -20°C until 16S DNA sequencing. V3 and V4 regions of 16S rRNA gene were amplified using PCR1F_460-PCR1R_460 primer pair (Supplementary Table S2). The amplicons were sequenced using Illumina MiSeq (ILLUMINA INC; Waltham, San Diego, CA, USA) at the INRAE GeT platform (GenoToul, Castanet-Tolosan, France), generating 250 bp paired-end reads. Raw data were processed with the rANOMALY⁶³ which relies on the dada2 R package to produce amplicon sequence variants (ASV) as taxonomic units. The resulting ASV table was filtered with a minimum relative abundance of 5×10^{-5} and used to perform statistical and diversity analyses.

Statistical analysis and data representation. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 9 (GraphPad Software; La Jolla, CA, USA). Amplicon sequencing data were explored with R version 3.5.3 and Explore Metabar, accessible from the Migale server (<https://shiny.migale.inrae.fr/app/exploremetabar>)⁶³. Alpha diversity was explored with the Observed index for richness and the Shannon index for evenness. Pairwise comparison between time points were tested with TukeyHSD test and adjusted *P*-values were reported. Distances between samples (Beta diversity) were measured with unweighted unifrac distances and projected on a two dimensional spaces by Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS). Group of samples are compared by a pairwise Adonis test. A *P*-value of less than 0.05 was considered as significant.

Data availability

The 16S rRNA gene sequences datasets generated and analyzed in this study are available in the NCBI repository with the BioProject ID: PRJEB52868 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Received: 31 May 2022; Accepted: 27 September 2022

Published online: 10 October 2022

References

1. Gorrie, C. L. *et al.* Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients. *Clin. Infect. Dis.* **65**, 208–215 (2017).
2. 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).
3. Grall, N., Andremont, A. & Armand-Lefèvre, L. Résistance aux carbapénèmes: Vers une nouvelle impasse ?. *J. des Anti-infectieux* **13**, 87–102 (2011).
4. Paczosa, M. K. & Mecsas, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**, 629–661 (2016).
5. Gonzalez-Ferrer, S. *et al.* Finding order in the chaos: Outstanding questions in *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis. *Infect. Immun.* **89**, e00693–e720 (2021).
6. Martin, R. M. *et al.* Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *mSphere* **1**, 00261–16 (2016).
7. Joseph, L., Mercieca, T., Forestier, C., Balestrino, D. & Miquel, S. From *Klebsiella pneumoniae* colonization to dissemination: An overview of studies implementing murine models. *Microorganisms* **9**, 1282 (2021).
8. Russo, T. A. & Marr, C. M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin. Microbiol. Rev.* **32**, 42 (2019).
9. Wu, K.-M. *et al.* Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *J. Bacteriol.* **191**, 4492–4501 (2009).
10. Kislichkina, A. A. *et al.* Genome sequencing and comparative analysis of three hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Russia. *Pathog. Dis.* **75**, 4 (2017).
11. Bagley, S. T. Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **6**, 52–58 (1985).
12. Podschun, R., Pietsch, S., Höller, C. & Ullmann, U. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3325–3327 (2001).
13. Buffie, C. G. & Pamer, E. G. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 790–801 (2013).
14. Tsirigotaki, A., De Geyter, J., Šoštaric, N., Economou, A. & Karamanou, S. Protein export through the bacterial Sec pathway. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 21–36 (2017).
15. Chagnot, C., Zorgani, M. A., Astruc, T. & Desvaux, M. Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Front. Microbiol.* **4**, (2013).
16. Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. & AlaAldeen, D. Type V protein secretion pathway: The autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 692–744 (2004).
17. Pukatzki, S. *et al.* Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *PNAS Nexus* **103**, 1528–1533 (2006).
18. Wood, T. E., Aksoy, E. & Hachani, A. From Welfare to Warfare: The Arbitration of Host-Microbiota Interplay by the Type VI Secretion System. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **10**, 587948 (2020).
19. Journet, L. & Cascales, E. The Type VI Secretion system in *Escherichia coli* and related species. *EcoSal Plus* **7**, (2016).
20. Basler, M. Type VI Secretion System: secretion by a contractile nanomachine. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **370**, 20150021 (2015).
21. Hachani, A., Wood, T. E. & Filloux, A. Type VI secretion and anti-host effectors. *Curr. Opin. Microbiol.* **29**, 81–93 (2016).

22. Durand, E., Cambillau, C., Cascales, E. & Journet, L. VgrG, Tle, and beyond: The versatile arsenal of Type VI secretion effectors. *Trends Microbiol.* **22**, 498–507 (2014).
23. Benz, J. & Meinhart, A. Antibacterial effector/immunity systems: It's just the tip of the iceberg. *Curr. Opin. Microbiol.* **17**, 1–10 (2014).
24. Hecht, A. L. *et al.* Strain competition restricts colonization of an enteric pathogen and prevents colitis. *EMBO Rep.* **17**, 1281–1291 (2016).
25. Allsopp, L.P., Bernal, P., Nolan, L.M. & Filloux, A. Causalities of war: The connection between type VI secretion system and microbiota. *Cell Microbiol.* **22**, (2020).
26. Sana, T. G. *et al.* *Salmonella* Typhimurium utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. *PNAS Nexus* **113**, E5044–E5051 (2016).
27. Anderson, M. C., Vonaesch, P., Saffarian, A., Marteyn, B. S. & Sansonetti, P. J. *Shigella sonnei* encodes a functional T6SS used for interbacterial competition and niche occupancy. *Cell Host Microbe* **21**, 769–776.e3 (2017).
28. Sarris, P. F., Zoumidakis, C., Panopoulos, N. J. & Scoulia, E. V. Distribution of the putative type VI secretion system core genes in *Klebsiella* spp. *Infect. Genet. Evol* **11**, 157–166 (2011).
29. Lery, L.M. *et al.* Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* genomes identifies a phospholipase D family protein as a novel virulence factor. *BMC Biol.* **12**, (2014).
30. Liu, L. *et al.* Identification and characterization of an antibacterial Type VI secretion system in the Carbapenem-resistant strain *Klebsiella pneumoniae* HS11286. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **7**, (2017).
31. Zhou, M. *et al.* Epidemiology and molecular characteristics of the type VI secretion system in *Klebsiella pneumoniae* isolated from bloodstream infections. *J. Clin. Lab. Anal.* **34**, e23459 (2020).
32. Liao, W. *et al.* Distribution of type VI secretion system (T6SS) in clinical *Klebsiella pneumoniae* strains from a Chinese hospital and its potential relationship with virulence and drug resistance. *Microb. Pathog.* **162**, 105085 (2022).
33. Wong Fok Lung, T. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* induces host metabolic stress that promotes tolerance to pulmonary infection. *Cell Metab.* S1550413122000973 (2022).
34. Russell, A. B. *et al.* Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature* **496**, 508–512 (2013).
35. Jurénas, D. & Journet, L. Activity, delivery, and diversity of Type VI secretion effectors. *Mol. Microbiol.* **115**, 383–394 (2021).
36. Li, W. *et al.* Identification and comparative genomic analysis of Type VI secretion systems and effectors in *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol.* **13**, 853744 (2022).
37. Abby, S. S., Nérón, B., Méninger, H., Touchon, M. & Rocha, E. P. C. MacSyFinder: A program to mine genomes for molecular systems with an application to CRISPR-Cas systems. *PLoS ONE* **9**, e110726 (2014).
38. Abby, S. S. *et al.* Identification of protein secretion systems in bacterial genomes. *Sci. Rep.* **6**, 23080 (2016).
39. Guilhem, C. *et al.* Colonization and immune modulation properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilm-dispersed cells. *npj Biofilms Microbiomes* **5**, 25 (2019).
40. Barbosa, V. A. A. & Lery, L. M. S. Insights into *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system transcriptional regulation. *BMC Genom.* **20**, 1 (2019).
41. Chew, K. L., Octavia, S., Lai, D., Lin, R. T. P. & Teo, J. W. P. Genomic characterization of *Klebsiella quasipneumoniae* from clinical specimens in Singapore. *Antimicrob. Agents Chemother.* **65**, e00412-e421 (2021).
42. 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. Biol. Chem.* **219**, 637–647 (2019).
43. Coulthurst, S. The Type VI secretion system: A versatile bacterial weapon. *Microbiology* **165**, 503–515 (2019).
44. Unterweger, D., Kostiuk, B. & Pukatzki, S. Adaptor proteins of Type VI secretion system effectors. *Trends Microbiol.* **25**, 8–10 (2017).
45. Chen, C., Yang, X. & Shen, X. Confirmed and potential roles of bacterial T6SSs in the intestinal ecosystem. *Front. Microbiol.* **10**, 1484 (2019).
46. Storey, D. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system-mediated microbial competition is PhoPQ controlled and reactive oxygen species dependent. *PLoS Pathog.* **16**, e1007969 (2020).
47. Ringel, P. D., Hu, D. & Basler, M. The role of Type VI secretion system effectors in target cell lysis and subsequent horizontal gene transfer. *Cell Rep.* **21**, 3927–3940 (2017).
48. Miller, C. P. & Bohnhoff, M. Changes in the mouse's enteric microflora associated with enhanced susceptibility to *Salmonella* infection following streptomycin treatment. *J. Biol. Chem.* **113**, 59–66 (1963).
49. Gu, S. *et al.* Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract. *PLoS ONE* **8**, e74957 (2013).
50. Hay, A. J. & Zhu, J. In Sickness and in Health. in *Advances in Applied Microbiology* vol. 96, 43–64 (Elsevier, 2016).
51. Bachmann, V. *et al.* Bile salts modulate the mucin-activated Type VI secretion system of pandemic *Vibrio cholerae*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0004031 (2015).
52. Brunet, Y. R., Bernard, C. S., Gavioli, M., Lloubès, R. & Cascales, E. An epigenetic switch involving overlapping fur and DNA methylation optimizes expression of a Type VI secretion gene cluster. *PLoS Genet.* **7**, e1002205 (2011).
53. Gallegos-Monterrosa, R. & Coulthurst, S.J. The ecological impact of a bacterial weapon: microbial interactions and the Type VI secretion system. *FEMS Microbiol. Rev.* **45**, fuab033 (2021).
54. Chassaing, B. & Cascales, E. Antibacterial weapons: Targeted destruction in the microbiota. *Trends Microbiol.* **26**, 329–338 (2018).
55. Speare, L., Woo, M., Dunn, A. K. & Septer, A. N. A Putative lipoprotein mediates cell-cell contact for Type VI secretion system-dependent killing of specific competitors. *mBio* e03085-21 (2022).
56. do Nascimento Soares, T. *et al.* The C-terminal extension of VgrG4 from *Klebsiella pneumoniae* remodels host cell microfilaments. *Proteins Prot.* **90**, 26344. <https://doi.org/10.1002/prot.26344> (2022).
57. Lam, M. M. C. *et al.* A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. *Nat. Commun.* **12**, 4188 (2021).
58. Perrin, A. & Rocha, E. P. C. PanACoTA: a modular tool for massive microbial comparative genomics. *NAR Genom. Bioinform.* **3**, Iqaa106 (2021).
59. Minh, B. Q. *et al.* IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol. Biol. Evol.* **37**, 1530–1534 (2020).
60. Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS Nexus* **97**, 6640–6645 (2000).
61. 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).
62. Flaughnati, N. *et al.* A phospholipase A1 antibacterial Type VI secretion effector interacts directly with the C-terminal domain of the VgrG spike protein for delivery. *Mol. Microbiol.* **99**, 1099–1118 (2016).
63. Theil, S. & Rifa, E. rANOMALY: AmplicoN wOrkflow for Microbial community AnaLYsis. *F1000Res* **10**, 7 (2021).
64. Guy, L., Roat Kultima, J. & Andersson, S. G. E. genoPlotR: Comparative gene and genome visualization in R. *Bioinformatics* **26**, 2334–2335 (2010).
65. Chaveroche, M.-K. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* **28**, 97e–997 (2000).

66. Jurénas, D. *et al.* Mounting, structure and autocleavage of a type VI secretion-associated Rhs polymorphic toxin. *Nat. Commun.* **12**, 6998 (2021).

Acknowledgements

We thank members of the PhD Committee of T.M: D. Boucher (M2iSH laboratory, UCA) and M. Meynier (NeuroDol laboratory, UCA), and E. Cascales (Laboratoires d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires, Aix-Marseille University) as well as P. Langella and G. Orianne (MICALIS, INRAE) for his expertise in the field. We also thank D. Jurenas for providing pBAD33 plasmids, N. Charbonnel for technical support in mice experiments and in molecular biology. We would like to thank H. Billard and J. Colombet, Plateforme CYSTEM – UCA PARTNER (Clermont-Ferrand, France), for their technical support and expertise. We would like to thank M. Boyer, C. Besnard and T. Fleury for their implication in the project during their internship. This work was supported by a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et de l'Innovation awarded to T.M. S.M. acknowledges support received from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) of the French government through the program Investissements d'Avenir (16-IDEX-0001 CAP 20-25), EMERGENCE 2018. O.R is funded by an ANR JCJC (Agence national de recherche) grant [ANR 18 CE12 0001 01 ENCAPSULATION].

Author contributions

T.M., S.M., and C.F. conceived the project. T.M., S.M., C.F., S.B., and O.R., designed the experiments. T.M., S.M., S.B., S.T., and O.R. performed in silico analysis. T.M., S.M., L.N., performed in vitro and in vivo assays. T.M., S.M., C.F., S.B., and O.R. wrote the manuscript with contribution from all the authors.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21396-w>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

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



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 licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence 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 licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

Commentaire d'article

Ce travail de thèse avait pour objectif la caractérisation d'un facteur de pathogénicité récemment identifié chez *K. pneumoniae*, le système de sécrétion de type VI. Jusqu'alors, seule une description du SST6 dans des souches de *K. pneumoniae* hypervirulentes avait été faite, associée à des activités anti-eucaryotes (levures, amibes) et anti-procaryotes (*E. coli*). Nous nous sommes donc intéressés au SST6 dans les souches classiques, avec pour référence la souche *K. pneumoniae* CH1157. La présence de plusieurs îlots de pathogénicité apparentés au SST6 a été mise en évidence au sein de plusieurs génomes du genre *Klebsiella spp.*, dans des souches d'origine géographique différente. Concernant la souche CH1157, le modèle d'étude du laboratoire, deux îlots de pathogénicité apparentés au SST6 ont été identifiés *in silico*, ainsi nommés SST6-1 et SST6-2. Le SST6-1 possède l'intégralité des core gènes codant un SST6 fonctionnel, ainsi qu'un système toxine antitoxine, codant un effecteur de type phospholipase (Tle1) et trois protéines de l'immunité Tli1. L'expression de cet effecteur en système hétérologue (*E. coli* DH5 α) a permis de montrer *in vitro* sa capacité à déstabiliser les membranes des bactéries ciblées par le SST6. De plus, l'implication du SST6-1 dans la colonisation intestinale a été montrée *in vivo* et a permis de démontrer son rôle dans la persistance locale de *K. pneumoniae* au niveau intestinal, avec une action ciblant potentiellement des membres de la famille des Oscillospiraceae et corrélée à une dysbiose du microbiote. L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication dans la revue Scientific Reports.

Des résultats supplémentaires viennent compléter ces données. La caractérisation de l'effet *in vitro* du SST6-1 et de son effecteur Tle1 a été poursuivie par des approches complémentaires d'analyse en microscopie et *via* des expériences de compétition. Ensuite, la régulation du SST6 de la souche CH1157 a été investiguée par des approches *in silico* et *in vitro*, afin d'identifier les conditions stimulant l'activité du SST6. Enfin, le rôle du SST6-2-a fait l'objet d'études complémentaires, notamment pour identifier l'implication de l'effecteur potentiel Tke1 dans l'activité antibactérienne.

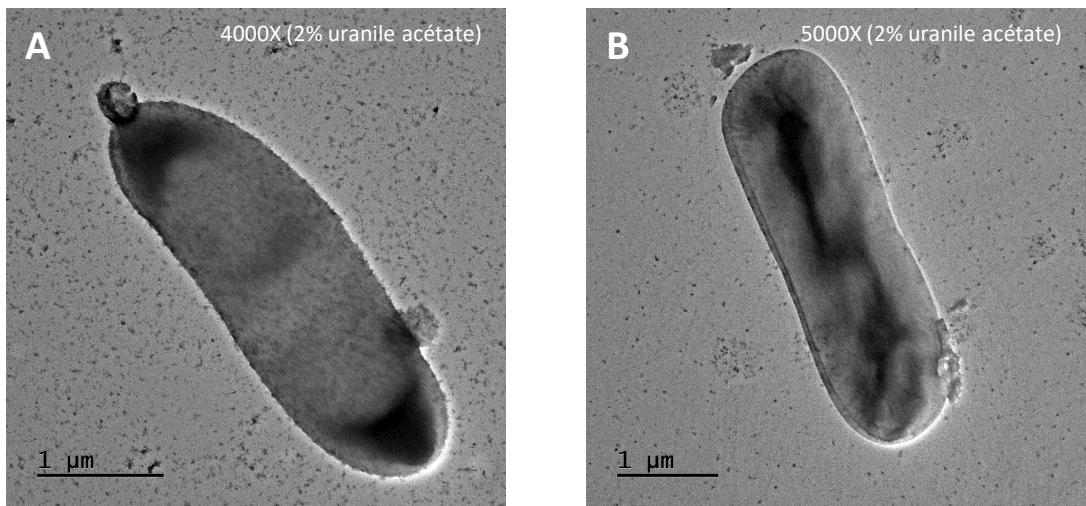


Figure 56. Observation des structures membranaires de *E. coli* DH5 α /pBAD33-ssOmpA-tle1 et *E. coli* DH5 α /pBAD33-ssOmpA au microscope électronique à transmission. Le culot formé de cellules bactériennes (A : DH5 α /pBAD33-ssOmpA-tle1 / B : DH5 α /pBAD33-ssOmpA) est observé au MET après contraste à l'uranile acétate 2%, permettant d'apprecier l'organisation périplasmique. L'échelle de taille ainsi que le grossissement sont indiqués sur les photos. Chaque photo est représentative d'un individu contenu dans l'échantillon.

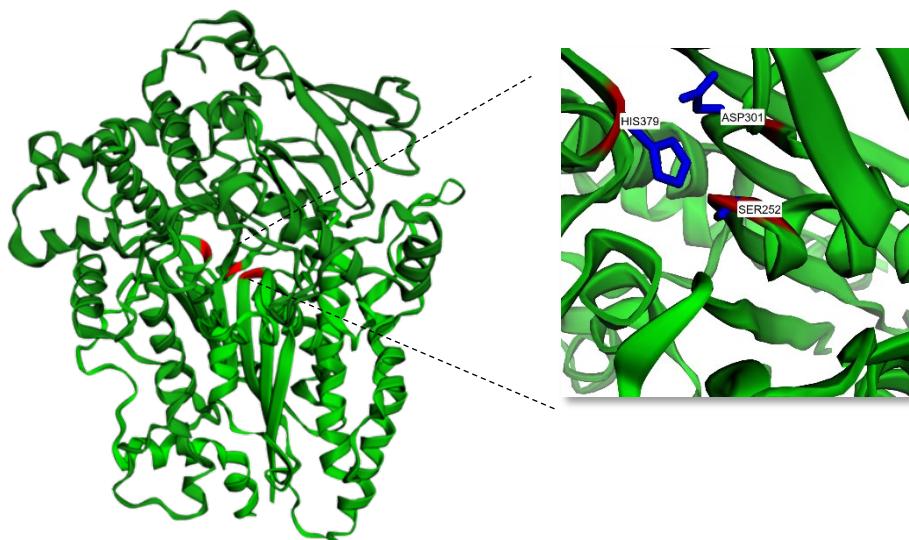


Figure 57. Modélisation 3D de la phospholipase Tle1 du SST6-1 de CH1157 et de son site actif. La modélisation 3D de Tle1 a été réalisée grâce au software en ligne EzMol (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/ezmol/>). La région de la protéine contenant la triade catalytique S252-D301-H379 (rouge et bleue) est agrandie dans le carré de droite.

1. Caractérisation fonctionnelle du SST6-1 codant la toxine Tle1 chez *K. pneumoniae* CH1157

Les résultats présentés dans la publication n°2 ont montré que la production de la phospholipase Tle1 au niveau périplasmique d'une souche *E. coli* DH5 α ne possédant pas d'antitoxine Tli était clairement délétère pour la bactérie. Une étude par cytométrie en flux après marquage au SYBR Green et à l'iodure de propidium (IP) a permis de mettre en évidence une perméabilité membranaire accrue lorsque Tle1 est exprimée dans le périplasme d'*E. coli*, ainsi qu'un défaut de croissance marqué en milieu liquide et solide (microcolonies sur gélose). Ces résultats ont été confirmés par des observations en microscopie électronique à transmission (MET) permettant d'apprécier la structure et l'organisation des phospholipides membranaires des souches d'*E. coli* DH5 α produisant Tle1. Ainsi la souche DH5 α /pBAD33-ssOmpA-tle1 présente une membrane déstructurée, avec des aspérités et des irrégularités marquées, et un périplasme altéré (**Figure 56A**) alors que les structures membranaires d'une souche DH5 α /pBAD33-ssOmpA ne produisant pas Tle1 sont intactes, avec une régularité stricte du pourtour et un espace périplasmique visible et bien délimité (**Figure 56B**). De plus, la présence de bourgeonnement à l'extrémité apicale de la cellule productrice de Tle1 (**Figure 56A**) témoigne d'un stress marqué pouvant faire penser à des vésicules membranaires. Ces observations seraient en accord avec l'activité phospholipase de l'effecteur Tle1.

1.1. Caractérisation du système toxine/anti-toxine Tle1/Tli1

La structure 3D de la phospholipase Tle1 isolée de la souche CH1157 ainsi que la nature de son site catalytique ont été identifiées et modélisées *in silico* par homologie de séquence avec la toxine Tle1 déjà caractérisée dans la littérature (Liu *et al.*, 2017) (**Figure 57**). Le site actif de Tle1 se présente sous la forme d'une triade catalytique, composée de 3 acides aminés : une sérine en position 252, un acide aspartique en position 301 et une histidine en position 379 (**Figure 57**).

Une approche de mutagénèse dirigée du gène *tle1* cloné dans le plasmide vecteur pBAD33-ssOmpA a été envisagée pour vérifier l'abolition de la toxicité médiée par cet effecteur. Un remplacement *in situ* des nucléotides codant chacun des acides aminés appartenant au site catalytique a été réalisé (deux substitutions simples -*tle1*:D301A et *tle1*:S252A- et une substitution double -*tle1*:H379A-). Nous avons ainsi montré que la

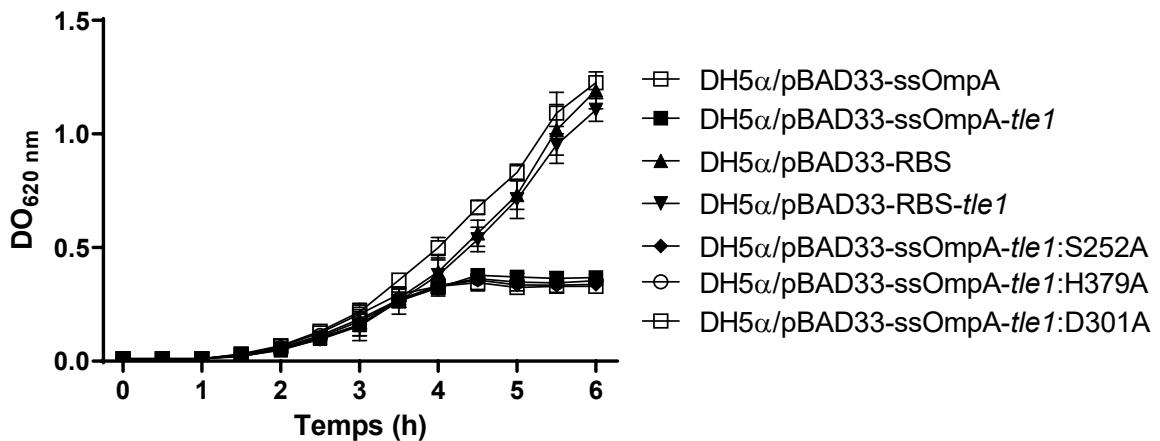
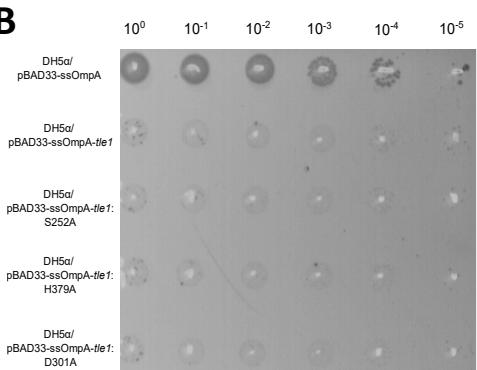
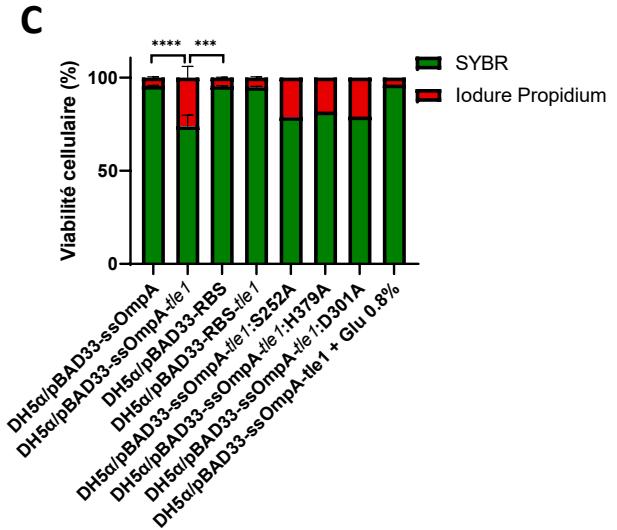
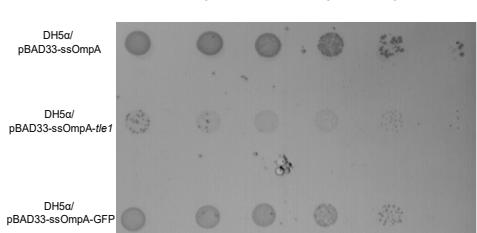
A**B****C****D**

Figure 58. Effet cytotoxique de la phospholipase Tle1 en système hétérologue chez *E. coli* DH5α.
(A) Cinétiques de croissance des différentes souches d'*E. coli* DH5α portant les différentes constructions pBAD33 en milieu LB liquide contenant 0,2% d'arabinose. **(B&D)** Observation de la morphologie des colonies des différentes souches après ajustement de chaque culture à $DO_{620\text{nm}}=0,2$. 10 μL de chaque dilution sérielle sont ensuite étalés sur milieu LB solide contenant 0,2% d'arabinose et 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de chloramphénicol. **(C)** Evaluation de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux associée à un marquage SYBR Green et iodure de propidium. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules positives au SYBR Green (vert) et de cellules positives à l'iодure de propidium (rouge) au sein d'un échantillon. Statistiques : Test non paramétrique de Kruskall-Wallis avec test post-hoc de comparaison multiples de Dunn. $P<0,05$: * ; $P<0,01$: ** ; $P<0,001$: ***

production de toxine chimérique au niveau périplasmique chez *E. coli* DH5 α (DH5 α /pBAD33-ssOmpA-tle1:S252A ; DH5 α /pBAD33-ssOmpA-tle1:D301A ; DH5 α /pBAD33-ssOmpA-tle1:H379A) affecte la croissance bactérienne, le phénotype des colonies sur gélose et la perméabilité membranaire de la même façon que la toxine native (**Figure 58ABC**). Les mutations du site catalytique de Tle1 n'abolissent donc pas la toxicité induite par cet effecteur lorsqu'il est présent au niveau périplasmique d'*E. coli* DH5 α . La production et l'adressage périplasmique d'une protéine quelconque par le plasmide pBAD33 pourraient conduire à l'accumulation de celle-ci au niveau du périplasme de la bactérie et expliquer la non-restauration des phénotypes dans les souches produisant les phospholipases mutées dans leur site catalytique. Pour vérifier cette hypothèse, un gène codant une GFP a été amplifié à partir de l'ADN génomique de la souche *K. pneumoniae* LM21- Δ shv1:gfp, et cloné dans le pBAD33-ssOmpA sous le contrôle du promoteur inductible à l'arabinose. La morphologie de colonies d'*E. coli* DH5 α portant pBAD33-ssOmpA-GFP est similaire à celle des colonies obtenues avec la souche contrôle DH5 α /pBAD33-ssOmpA (**Figure 58D**). Le phénotype de microcolonies observé lors de la production périplasmique de Tle1 est donc bien spécifique et n'est pas dû à une accumulation d'une protéine dans l'espace périplasmique.

L'effet toxique de Tle1 a été montré lors de sa production périplasmique dans une souche d'*E. coli* DH5 α . Cependant, cette espèce ne possède pas de SST6 ni d'antitoxine Tli pouvant contrer Tle1. Pour tester si Tli est une protéine d'immunité capable de contrer Tle1, les constructions pBAD33-ssOmpA-tle1 et pBAD33-RBS-tle1 et leurs contrôles respectifs ont été introduits dans la souche sauvage CH1476 et la souche CH1476 délestée de l'intégralité du système toxine-antitoxine du SST6-1 (CH1476- Δ TA). La capacité de croissance de *K. pneumoniae* produisant Tle1 au niveau périplasmique est impactée par rapport aux conditions contrôles (**Figure 59AB**), ainsi que la morphologie des colonies (**Figure 59CD**), et ce indépendamment de la capacité à synthétiser l'antitoxine Tli. L'absence d'inhibition de l'activité toxique de Tle1 en présence de Tli peut être expliquée par une balance stoechiométrique déséquilibrée. En effet, la quantité de toxine Tle1 produite au niveau périplasmique par le pBAD33 est certainement supérieure à la quantité d'antitoxine Tli produite par CH1476 WT.

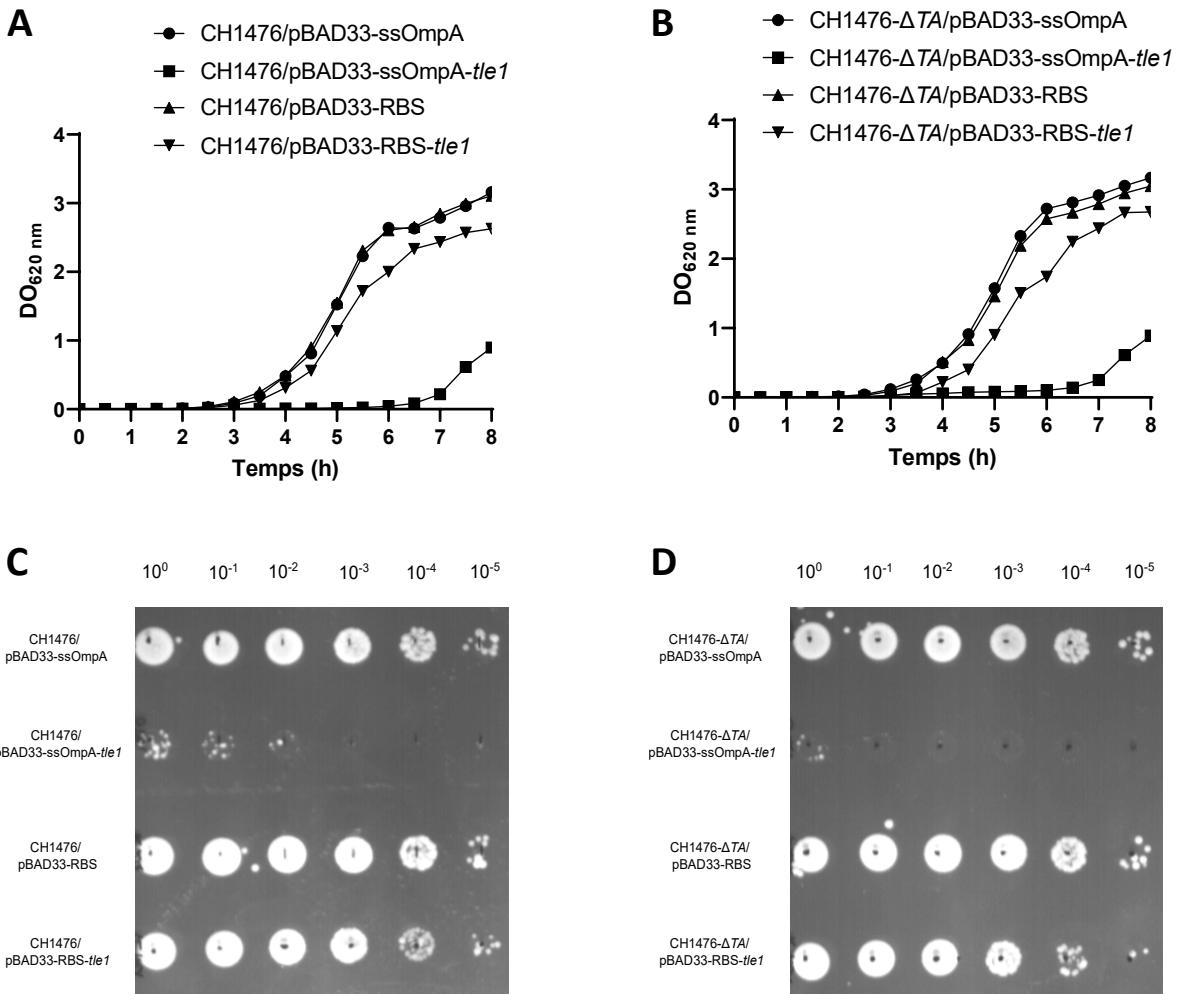


Figure 59. Effet cytotoxique de la phospholipase Tle1 en intra-espèce chez *K. pneumoniae* CH1476 et CH1476-ΔTA. **(A&B)** Cinétiques de croissance des souches CH1476 (A) et CH1476-ΔTA (B) portant les différentes constructions pBAD33 en milieu LB liquide contenant 0,2% d'arabinose. **(C&D)** Observation de la morphologie des colonies des souches CH1476 (C) et CH1476-ΔTA (D) après ajustement de chaque culture à $OD_{620\text{nm}}=0,2$. 10 μL de chaque dilution sérielle sont ensuite étalés sur milieu LB solide contenant 0,2% d'arabinose et 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de chloramphénicol.

Si l'activité toxique de Tle1 a été démontrée *via* des approches de clonage directionnel, la capacité de *K. pneumoniae* à tuer des proies bactériennes, médiée par le SST6 a été également investiguée *in vitro* en réalisant des tests de compétition inter-bactérienne.

1.2. Test de l'activité antibactérienne de Tle1 par contact direct

Ces manipulations consistent à mettre en contact une bactérie possédant le SST6 (*K. pneumoniae* CH1157) (attaquante) avec une bactérie qui en est dépourvue (réceptrice) et de quantifier la survie de cette dernière. Différentes espèces bactériennes ont été utilisées en tant que cibles potentielles du SST6 de *K. pneumoniae* au cours de cette étude :

- Plusieurs souches **d'*E. coli***, dont certaines déjà utilisées en tant que réceptrices dans la littérature (*E. coli* K12 MG1655, *E. coli* K12 W3110, AIEC LF82, *E. coli* commensal murin isolé du microbiote intestinal de souris). Aucune activité antibactérienne n'a été mise en évidence dans ces conditions.

- Trois souches cultivables de ***Faecalibacterium prausnitzii*** et dont le génome est complètement séquencé (L2-6, M21/2, A2-1652). Cette espèce, représentative de la famille des *Oscillospiraceae*, est un commensal bénéfique pour la santé de l'hôte. Nous n'avons cependant pas pu aboutir à un résultat en raison de problèmes techniques. En effet, *F. prausnitzii* étant une bactérie extrêmement sensible à l'oxygène, sa culture nécessite des conditions anaérobies strictes, technique non disponible à l'heure actuelle au laboratoire. De plus, l'ajout d'antibiotiques sélectifs des souches de *F. prausnitzii* dans les géloses au terme de l'expérience a été nécessaire pour la sélection des bactéries survivantes. Au vu des CMI relativement faibles pour les antibiotiques utilisés, ceux-ci n'ont pas permis une sélection stricte de *F. prausnitzii* vis-à-vis de *K. pneumoniae*.

- Deux souches représentatives du genre ***Bacteroides*** : *Bacteroides fragilis* DSM2151 et *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482. Cependant, l'activité antibactérienne de *K. pneumoniae* vis-à-vis de ces deux espèces n'a pu être démontrée ; bien que *B. fragilis* ait été cultivée et quantifiée en présence de *K. pneumoniae*, aucune activité antibactérienne n'a pu être mise en évidence dans les conditions testées. Enfin, la culture de *B. thetaiotaomicron* (espèce extrêmement sensible à l'oxygène) n'a été possible dans nos conditions de laboratoire.

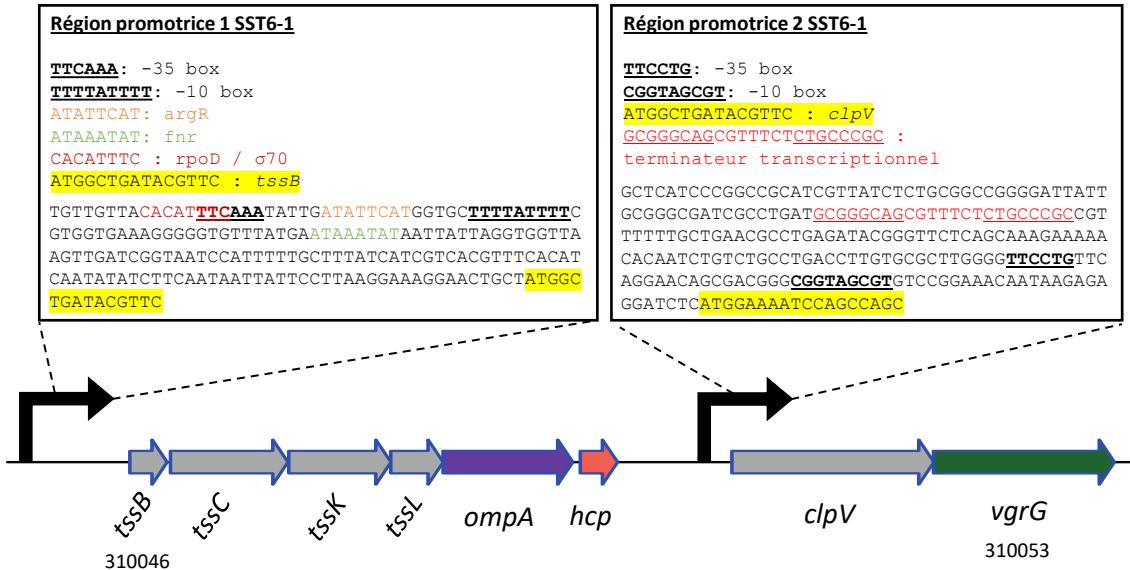
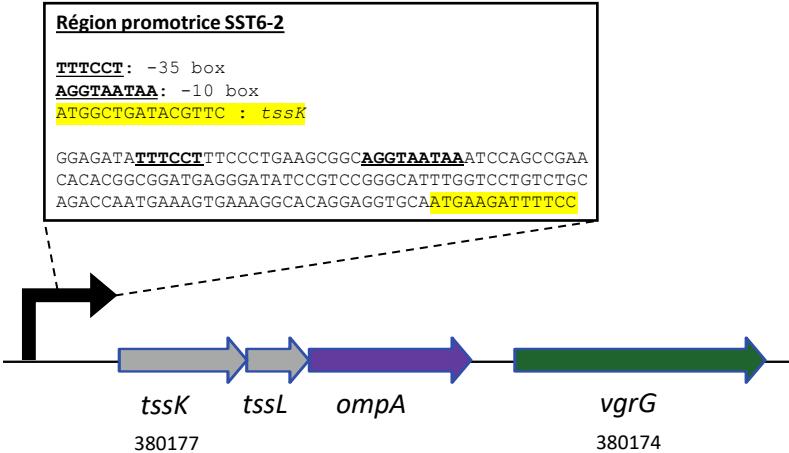
A**B**

Figure 60. Représentation schématique des régions promotrices et potentiels sites de fixation de régulateurs transcriptionnels du SST6-1 (A) et SST6-2 (B). L'organisation génomique des premiers gènes des SST6-1 et -2 est schématisée (5'-3'), ainsi que la nomenclature correspondante. La présence de régions promotrices a été identifiée par analyse *in silico* des séquences nucléotidiques de la souche CH1157, sur une plateforme en ligne BPROM (<http://www.softberry.com>). Les séquences nucléotidiques de chaque région intergénique sont représentées sous leur forme 5'-3' dans les cadre noir. Au niveau du SST6-1 (A) et -2 (B), deux et une régions promotrices potentielles ont été identifiées, respectivement. Les boîtes -10 et -35 sont soulignées et écrites en gras (5'-XXXX-3'). La présence de sites de fixation est reportée en couleur. Les gènes du SST6 sont soulignés en jaune.

D'autres investigations sont nécessaires pour confirmer le potentiel de ces espèces membres du microbiote intestinal et potentiellement cibles du SST6 de *K. pneumoniae*. Pour cela, la régulation de ce SST6 est également à prendre en compte, car un environnement spécifique propre aux conditions retrouvées dans le tube digestif pourrait permettre l'activation de ce système.

1.3. Régulation de l'expression du SST6-1 chez *K. pneumoniae* CH1157

Il a été montré dans la littérature que plusieurs stress peuvent activer la transcription des gènes du SST6 des Entérobactéries. Pour cette raison, nous avons choisi d'analyser la régulation transcriptionnelle du SST6 de la souche *K. pneumoniae* CH1157 *in silico* et *in vitro* par différentes approches.

La présence de deux régions promotrices au niveau du SST6-1 a été mise en évidence grâce à l'utilisation du logiciel BPROM (**Figure 60**). La première de ces régions est localisée en amont de l'opéron, avant le premier gène *tssB* et elle comporte 3 sites de fixations potentiels pour des régulateurs transcriptionnels : ArgR, Fnr, et RpoD (σ_70) (**Figure 60A**). La seconde région promotrice a été identifiée au milieu de l'opéron entre les séquences des gènes *hcp* et *clpV*. Dans cette région, aucun site de fixation de régulateur transcriptionnel n'est retrouvé mais un terminateur transcriptionnel sous la forme d'un hairpin a été identifié grâce au logiciel en ligne ARNold (structure « tige-boucle ») (**Figure 60A**). De fait, la présence de cette structure suggère deux unités transcriptionnelles distinctes du SST6-1. En effet, la surexpression des gènes du SST6-1 dans la souche CH1476-pZE2R1 - dont le promoteur a été remplacé par le promoteur fort constitutif PR du phage lambda - induit seulement la surexpression des gènes *tssB*, *tssC*, *tssK*, *tssL*, *ompA* et *hcp*. Ainsi, la délétion de la structure tige-boucle constituant le terminateur transcriptionnel a été envisagée, mais n'a pas abouti malgré l'utilisation de plusieurs techniques (remplacement du terminateur par une cassette de résistance à la kanamycine par double recombinaison homologue (Datsenko and Wanner, 2000), utilisation d'un plasmide suicide recombinant (pKNG101) pour excision du terminateur transcriptionnel (Kaniga *et al.*, 1991).

Afin de compléter cette approche *in silico*, une manipulation de type « promoteur capture » a été réalisée. Cette expérience débute par l'amplification d'une région promotrice d'intérêt avec des amorces biotinyliées et la fixation de ce fragment sur des billes magnétiques

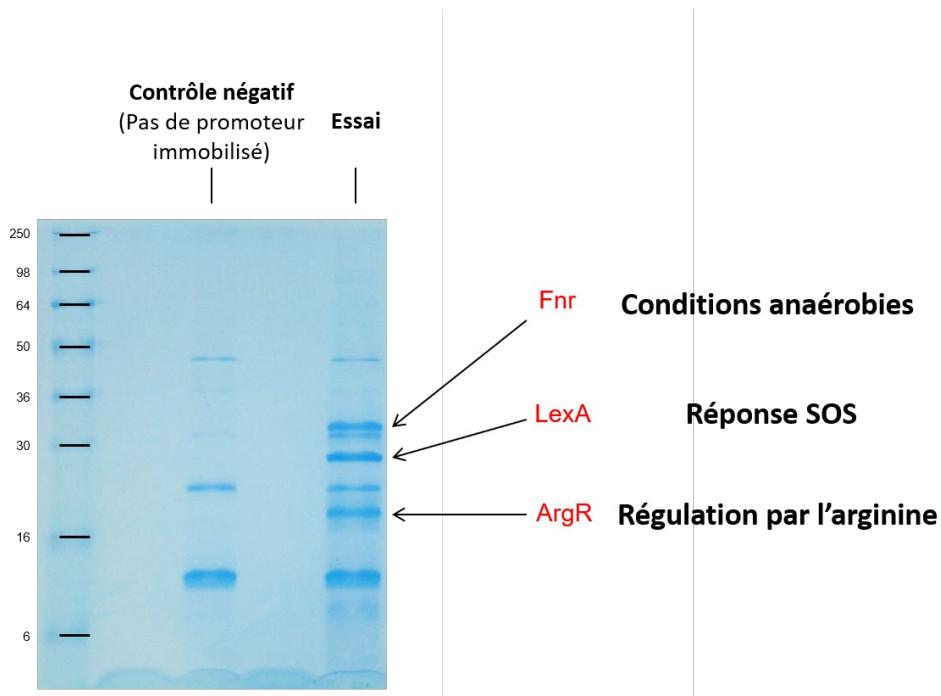


Figure 61. Identification des régulateurs transcriptionnels du SST6-1 de la souche CH1476 par analyse « promoter capture ». La photographie présente les deux échantillons déposés sur gel SDS-PAGE et séparés par électrophorèse. Le gel est coloré au bleu de Coomassie pour permettre la visualisation des bandes correspondant aux différents fragments analysés. L'ordre de dépôt est indiqué sur la figure, la condition « essai » étant les billes magnétiques couplées à la streptavidine, fixées avec le promoteur biotinylé. Les poids moléculaires sont indiqués à gauche de l'image. Les flèches noires représentent les bandes correspondant aux régulateurs transcriptionnels identifiés ultérieurement par spectrométrie de masse, reportés en rouge sur l'illustration.

de streptavidine. Un lysat bactérien est ensuite mis au contact des billes chargées afin de permettre les interactions de la région promotrice avec de potentiels régulateurs transcriptionnels. Cet échantillon (ainsi que son contrôle ne contenant que des billes non immobilisées) est ensuite soumis à migration électrophorétique sur gel SDS PAGE pour la visualisation des interactions. Les bandes apparaissant dans la piste contrôle correspondent à des protéines naturellement ubiquitinylées chez *K. pneumoniae*. Ainsi, quatre bandes différentielles de poids moléculaires respectifs de 8, 19, 28 et 32 kDa ont ainsi été observées (**Figure 61**). Leur analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier trois régulateurs transcriptionnels : ArgR (19kDa), Fnr (32 kDa) et LexA (28 kDa). La 4^e bande excisée correspondait à un produit de dégradation de LexA (8kDa). Ces résultats confirment les données obtenues *in silico* et suggèrent une régulation du SST6-1 par au moins deux facteurs : la présence d'acides aminés, dont l'arginine (ArgR), et une adaptation à des conditions anaérobies (Fnr : fumarate nitrase regulator). De plus, cette régulation pourrait être spécifique à la phase exponentielle (présence du site de fixation RpoD (σ_{70})) et ce en parallèle de la présence de stress activant la réponse SOS, comme suggéré par l'identification de LexA, un régulateur transcriptionnel répandu chez les bactéries et impliqué dans la réponse au stress global.

L'identification de ces sites potentiels de fixation nous a conduit à analyser la régulation du SST6 chez *K. pneumoniae* CH1157, afin d'identifier de potentiels stress ou conditions d'activité du SST6. L'expression des gènes du SST6-1 a été testée *in vitro* par RT-qPCR, en utilisant *tssB* comme gène cible (**Figure 62A**). L'ensemble des conditions testées sont répertoriées dans **l'annexe 1**. Trois catégories de conditions sont testées au vu des résultats obtenus :

- L'activité du SST6-1 de la souche classique *K. pneumoniae* CH1157 a été démontrée *in vivo* ; il serait donc exprimé et fonctionnel dans les conditions retrouvées au niveau du tractus gastro-intestinal et déjà caractérisées dans la littérature pour d'autres entérobactéries (présence de sels biliaires ou de mucines) (Bachmann *et al.*, 2015; Sana *et al.*, 2016b). Le SST6 pourrait également être activé de façon contact dépendante avec des cibles procaryotes ou eucaryotes du microbiote intestinal (incubation en milieu de culture pour cellules épithéliales intestinales TC7, incubation avec une bactérie réceptrice *E. coli* W3110).

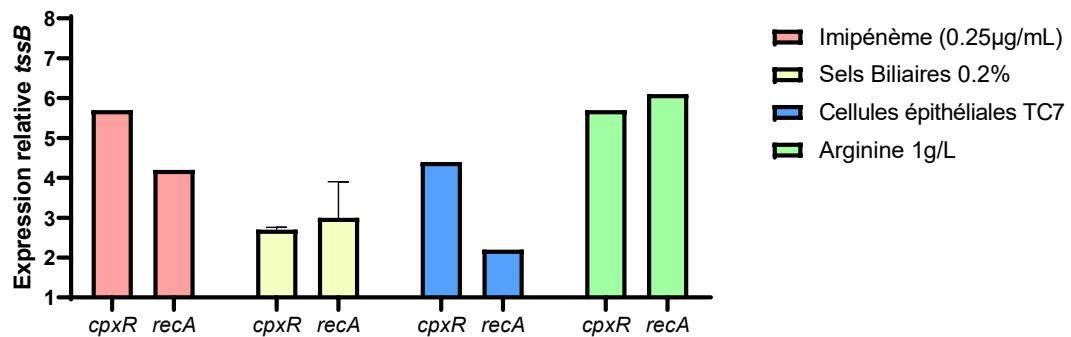
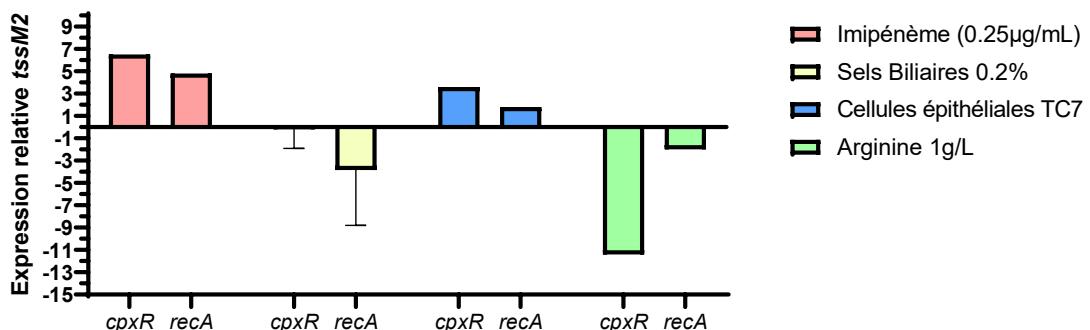
A**B**

Figure 62. Evaluation de l'expression relative du SST6-1 (A) et -2 (B) en différentes conditions de stress par RT-qPCR. L'expression relative des gènes *tssB* du SST6-1 et *tssM2* du SST6-2 en conditions de stress est évaluée par rapport à une condition contrôle (LB à 37°C ou MEM à 37°C planctonique) par RT-qPCR. Quatre stress sont appliqués : « ajout de 0,25µg/mL d'imipénème dans le milieu de culture LB » (Imipénème (0,25µg/mL)), « ajout de 0.2% de sels biliaires dans le milieu de culture LB » (0.2% SB), « incubation dans du milieu de culture cellulaire MEM ayant été mis en contact de cellules épithéliales TC7 » (Cellules épithéliales TC7) et « ajout de 1g/L d'arginine dans le milieu de culture LB » (Arginine 1g/L). Les gènes de ménage *cpxR* et *recA* sont utilisés comme gènes de référence et les résultats sont exprimés en expression relative par rapport à la condition témoin (LB à 37°C planctonique).

- L'identification de sites de fixation de régulateurs transcriptionnels potentiels *in silico* et *in vitro* (ArgR, Fnr) nous a amené à vérifier l'impact de la supplémentation en arginine du milieu (1g/L) et de la culture anaérobie sur l'expression des gènes du SST6.

- Différents stress connus pour induire l'expression du SST6 chez des souches hypervirulentes de *K. pneumoniae* ont été testés (supplémentation du milieu en NaCl 595mM, H₂O₂ 1mM, ampicilline 25µg/mL, imipénème 0,25µg/mL, et pH 6) (Liu *et al.*, 2017; Storey *et al.*, 2020). Nous avons également testé un stress de température (25°C), préalablement décrit comme activant l'expression des gènes du SST6 chez *Pseudomonas* (Tao *et al.*, 2016).

Les augmentations des niveaux d'expression du gène *tssB* en conditions tests par rapport aux contrôles (et ce quel que soit le gène de ménage utilisé *cpxR* ou *recA*) sont présentées en **figure 62**: i) présence d'imipénème en concentration sub-inhibitrice (**Imipénème 0.25µg/mL**), ii) présence de 0.2% de sels biliaires (**Sels biliaires 0.2%**), iii) incubation dans un milieu MEM conditionné par la présence de cellules épithéliales intestinales TC7 (**Cellules épithéliales TC7**) et iv) supplémentation du milieu LB avec 1g/L d'arginine (**Arginine 1g/L**). La plus forte surexpression du gène *tssB* est observée en présence d'une concentration sub-inhibitrice en imipénème (+5.7 (*cpxR*) et +4.2 (*recA*)) et en présence d'arginine (+5.7 (*cpxR*) et +6.1 (*recA*)) (**Figure 62A**).

Ces résultats semblent indiquer une régulation du SST6-1 de *K. pneumoniae* CH1157 par un ensemble de stress environnementaux, mais ils restent à confirmer au vu de l'absence de réplicats biologiques. Il serait également intéressant de combiner les différents stress, notamment pour les conditions découlant de l'identification des régulateurs transcriptionnels identifiés (culture anaérobie en phase exponentielle, présence d'arginine 1g/L et d'imipénème 0.25µg/mL).

2. Caractérisation du rôle du SST6-2 codant la toxine Tke

Le SST6-2 de la souche CH1157 ne comporte pas l'intégralité des 13 cores gènes codant les constituants essentiels à la machinerie moléculaire du système de sécrétion. Cependant, la présence d'un effecteur potentiel du SST6 a été identifiée *in silico* et a fait l'objet d'une discussion dans la publication n°2. La séquence de cet effecteur, non décrit dans la littérature et nommé Tke (Type VI *Klebsiella* Effector), contient plusieurs domaines (domaine de liaison au peptidoglycane LysM (PF 01476.23) ; SLT transglycosylase (PF 01464.23) ; peptidase M23

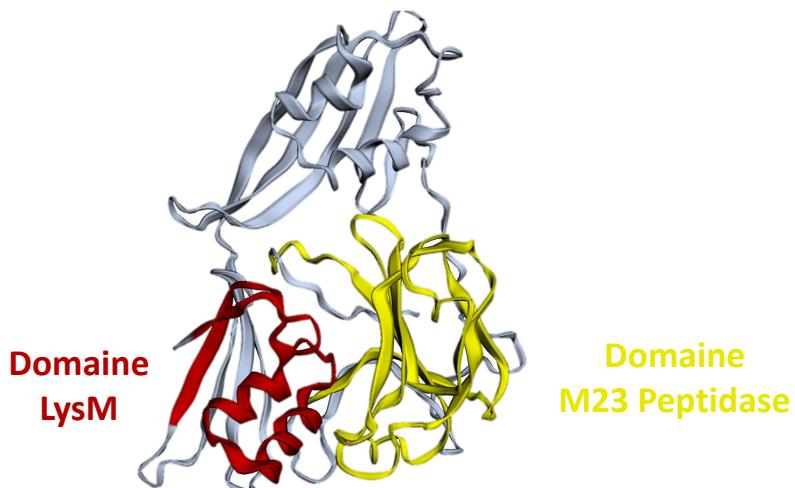


Figure 63. Modélisation 3D de la phospholipase Tke du SST6-2 de CH1157 et de ses domaines respectifs. La modélisation 3D de Tle1 a été réalisée grâce au software en ligne EzMol (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/ezmol/>). La région de la protéine contenant la triade catalytique S252-D301-H379 (rouge et bleue) est agrandie dans le carré de droite.

(PF 01551.25)) retrouvés dans d'autres effecteurs du SST6 (Type VI Amidase Effector (Tae) et Type VI Metallopeptidase Effector (Tpe)). La caractérisation de cet effecteur a été initiée par des approches *in vitro*, similaires à celles utilisées pour la caractérisation de l'effecteur Tle1 du SST6-1.

2.1. Caractérisation de Tke : structure et fonction

La structure de l'effecteur Tke contenant les domaines LysM de liaison au peptidoglycane et le domaine M23 peptidase est représentée en **figure 63**. L'effet de la production de Tke chez *E. coli* DH5 α au niveau périplasmique (DH5 α /pBAD33-ssOmpA-tke) ou cytoplasmique (DH5 α /pBAD33-RBS-tke) a été analysé par différentes approches. La croissance bactérienne est légèrement inhibée lors de la production périplasmique de la peptidase Tke dans la souche DH5 α /pBAD33-ssOmpA-tke (**Figure 64A**). Quelle que soit la souche, les colonies possèdent toutes un même morphotype sur gélose nutritive, contrairement à la production périplasmique de Tle1 qui induit des changements de morphotypes marqués (**Figure 64B**). La production périplasmique de Tke induit une diminution significative du nombre d'UFC/mL après 8h de croissance en milieu liquide, par rapport aux bactéries produisant Tke au niveau cytoplasmique ($P<0.05$) (**Figure 64C**). Cet effet antibactérien de Tke au niveau périplasmique s'accompagne d'un marquage à l'iodure de propidium augmenté par rapport aux souches contrôles (DH5 α /pBAD33-RBS, DH5 α /pBAD33-ssOmpA-tke et DH5 α /pBAD33-ssOmpA), suggérant une déstructuration des membranes médiée par l'effecteur Tke (**Figure 64D**).

2.2. Régulation de l'expression du SST6-2 chez *K. pneumoniae* CH1157

La régulation transcriptionnelle du SST6-2 a été également évaluée par les mêmes approches que précédemment (identification *in silico* de régulateurs transcriptionnels et RT-qPCR). La présence d'une région promotrice en amont du gène *tssK* du SST6-2 a été mise en évidence grâce à l'utilisation du logiciel BPROM (**Figure 60B**) mais aucun site de fixation de régulateur transcriptionnel n'a été identifié (**Figure 60B**).

En ce qui concerne la régulation de l'expression de cet îlot, dans les conditions testées en RT-qPCR, l'expression du gène *tssM* de l'îlot 2 est augmentée dans les conditions « Imipénème 0.25 μ g/mL » (+6.5 (*cpxR*) et +4.8 (*recA*)) et « Cellules épithéliales TC7 » (+3.6 (*cpxR*) et +1.8 (*recA*)) (**Figure 62B**). Les conditions « sels biliaires 0.2% » et « arginine 1g/L »

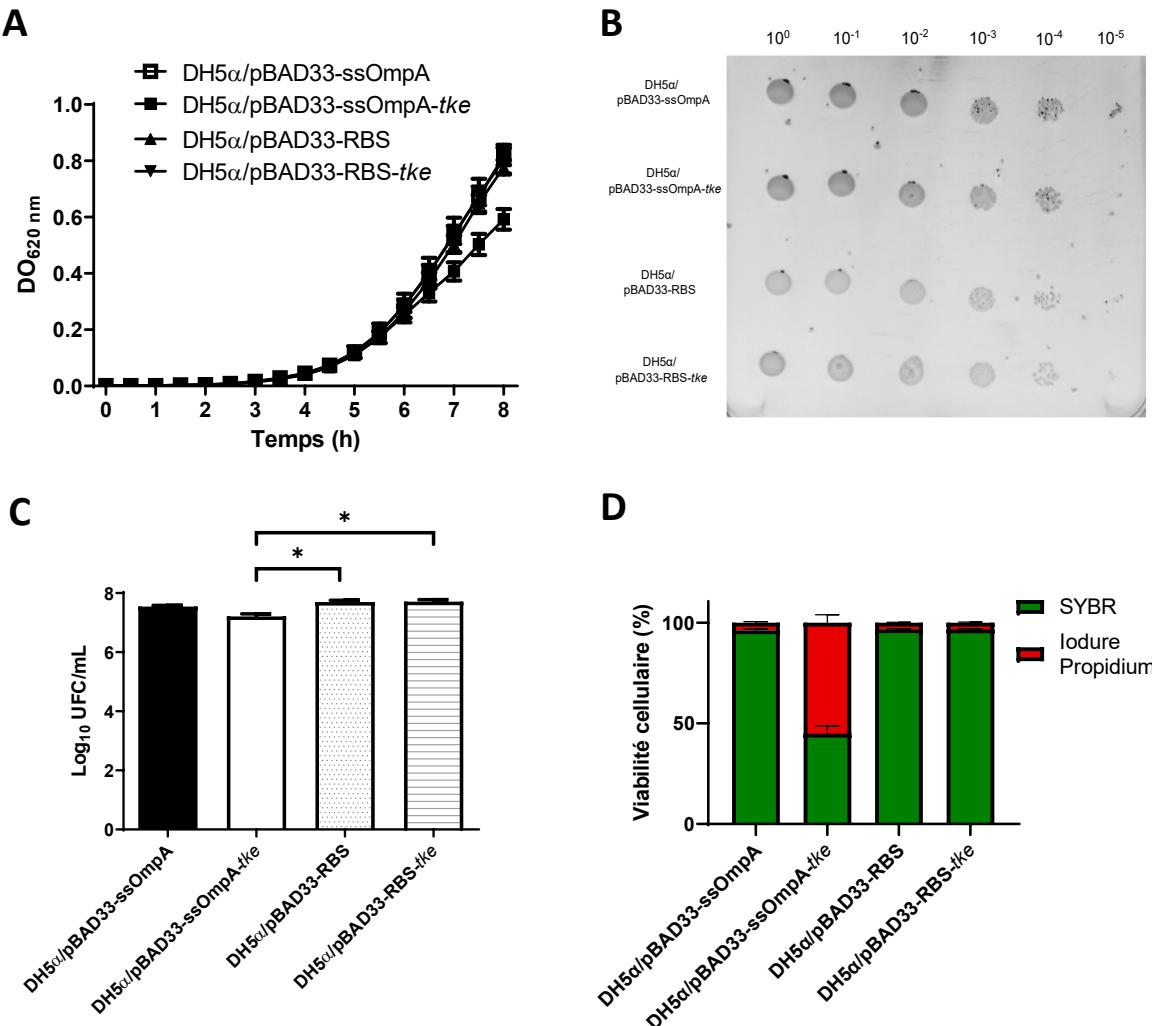


Figure 64. Effet cytotoxique de l'effecteur Tke en système hétérologue chez *E. coli* DH5 α . (A) Cinétiques de croissance des différentes souches d'*E. coli* DH5 α portant les différentes constructions pBAD33 en milieu LB liquide contenant 0,2% d'arabinose. (B) Observation de la morphologie des colonies des différentes souches après ajustement de chaque culture à $DO_{620\text{nm}}=0,2$. 10 μL de chaque dilution sérielle sont ensuite étalés sur milieu LB solide contenant 0,2% d'arabinose et 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de chloramphénicol. (C) Dénombrement des bactéries viables après 8h de culture en milieu LB liquide contenant 0,2% d'arabinose. (D) Evaluation de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux associée à un marquage SYBR Green et iodure de propidium. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules positives au SYBR Green (vert) et de cellules positives à l'iodure de propidium (rouge) au sein d'un échantillon. Statistiques : Test non paramétrique de Kruskall-Wallis avec test post-hoc de comparaison multiples de Dunn. $P<0,05$: * ; $P<0,01$: ** ; $P<0,001$: ***

induisent une sous expression du gène *tssM*. Là encore, il paraît indispensable de confirmer ces résultats en augmentant le nombre de réplicats biologiques. La différence d'expression du gène *tssM2* par rapport au gène *tssB* suggère une régulation différentielle pour ces 2 opérons SST6 chez *K. pneumoniae* CH1157.

L'ensemble de ces résultats montre que le SST6-1 de *K. pneumoniae* joue un rôle essentiel dans la colonisation à long terme du tractus gastro intestinal en modèle murin, associée à une modulation du microbiote intestinal. Ces observations sont en accord avec l'effet toxique de l'effecteur Tle1 du SST6-1 observé en système hétérologue. En effet, la capacité de Tle1 à hydrolyser les phospholipides membranaires a été mise en évidence, associée à un changement de morphotype marqué sur milieu solide et un défaut de croissance. Ces résultats ont été observés seulement lors d'une production spécifique de Tle1 au niveau périplasmique. Bien que l'effet antibactérien direct n'ait pas encore été mis en évidence en condition de compétition inter-bactérienne, le SST6 de *K. pneumoniae* CH1157 est régulé par un ensemble de conditions pouvant être rencontrées au sein de la niche écologique intestinale. Des potentiels sites de fixation pour les régulateurs transcriptionnels ArgR et Fnr ont été identifié *in vitro* et *in silico* au niveau du SST6-1, suggérant une régulation fine de ce système, encore à éclaircir. De plus, la présence de l'opéron SST6-2 au sein de la souche CH1157 nous questionne sur son utilisation et sa complémentarité vis-à-vis du SST6-1. Si celui-ci ne comporte pas l'intégralité des core gènes encodant la machinerie moléculaire, la présence d'un nouvel effecteur non caractérisé jusqu'alors, l'endopeptidase Tke, compte parmi l'arsenal d'effecteurs pouvant être sécrété par le SST6 de *K. pneumoniae* CH1157. La production périplasmique de cette endopeptidase associée à une perméabilité membranaire accrue en système hétérologue est en faveur d'une activité antibactérienne, directe ou indirecte, médiée par ce SST6 chez *K. pneumoniae* CH1157. Enfin, les phénomènes impliqués dans la régulation des gènes du SST6-2 semblent plus complexes à mettre en évidence par rapport au SST6-1, et restent à élucider.

Tableau 2. Souches bactériennes utilisées dans cette étude.

Identification	Description	Source et référence
Souches bactériennes		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
<i>K. pneumoniae</i> CH1157	Souche clinique de <i>K. pneumoniae</i> isolée d'un orifice de néphrectomie, Ap ^R	(Guilhen <i>et al.</i> , 2019)
<i>K. pneumoniae</i> CH1476	CH1157-Δshv1::spc, Sp ^R	(Guilhen <i>et al.</i> , 2019)
<i>K. pneumoniae</i> CH1476-ΔclpV	Mutant isogénique déléte du gène <i>clpV</i> , après excision de la cassette kanamycine, Sp ^R	Cette étude
<i>K. pneumoniae</i> CH1476-ΔtssB	Mutant isogénique déléte du gène <i>tssB</i> , après excision de la cassette kanamycine, Sp ^R	Cette étude
<i>K. pneumoniae</i> CH1476-ΔTA	Mutant isogénique déléte du système toxine-antitoxine (<i>tl1-tle1</i>), après excision de la cassette kanamycine, Sp ^R	Cette étude
<i>K. pneumoniae</i> CH1476-pZE2R1	CH1476 dont le promoteur 1 du SST6-1 a été remplacé par le promoteur fort constitutif PR du phage lambda, Km ^R	Cette étude
<i>K. pneumoniae</i> LM21-Δshv1::gfp	Souche clinique de <i>K. pneumoniae</i> isolée d'une plaie cutanée, dont le gène <i>shv1</i> a été remplacé par la GFP Mut3 couplée à une cassette de résistance à la spectinomycine, Sp ^R	Collection du laboratoire
<i>Echerichia coli</i>		
<i>E. coli</i> DH5α	F-, Δ(<i>argF-lac</i>)U169, <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , Δ(<i>lacZ</i>)M15, <i>relA</i> , <i>endA</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR</i>	Collection du laboratoire
<i>E. coli</i> AIEC LF82	Souche clinique d'AIEC isolée d'une lésion iléale chez un patient atteint de la maladie de Crohn (sérotype 083:H1), Rif ^R	(Darfeuille-Michaud <i>et al.</i> , 1998)
<i>E. coli</i> UPEC UFT073	Souche clinique UPEC isolée d'une pyélonéphrite, Rif ^R	(Mobley <i>et al.</i> , 1990)
<i>E. coli</i> K12 MG1655	<i>E. coli</i> K12 <i>fnr</i> , <i>gfp</i> , Km ^R	Collection du laboratoire
<i>E. coli</i> K12 W3110	<i>E. coli</i> K12 portant un plasmide pUA66- <i>rrnb</i> produisant la GFP sous le contrôle du promoteur fort constitutif <i>rrnb</i> ribosomal, Km ^R	(Flaugnatti <i>et al.</i> , 2016)
<i>Bacteroides spp.</i>		
<i>B. fragilis</i> DSM2151	Souche collection DSMZ, DSM No. : 2151	/
<i>B. thetaiotaomicron</i> VPI-5482	Souche collection ATCC, ATCC No. : 29148	(Wrzosek <i>et al.</i> , 2013)
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>		
<i>F. prausnitzii</i> L2-6	Commensal du microbiote intestinal anaérobie, Cm ^R	Donnée par P. Langella
<i>F. prausnitzii</i> M21/2	Commensal du microbiote intestinal anaérobie, Cm ^R	Donnée par P. Langella
<i>F. prausnitzii</i> A2-165	Souche collection DSMZ, DSM No. : 17677	(Wrzosek <i>et al.</i> , 2013)

Abréviations : Ampicilline (Ap) ; Spectinomycine (Sp) ; Kanamycine (Km) ; Chloramphénicol (Cm) ; Rifampicine (Rif)

3. Matériel et méthodes

Souches bactériennes, plasmides et amorces utilisées

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude, ainsi que leurs caractéristiques, sont présentées dans le **Tableau 2**. Les plasmides utilisés dans cette étude, ainsi que leurs caractéristiques, sont présentés dans le **Tableau 3**. Les couples d'amorces utilisés dans cette étude sont répertoriés dans l'**Annexe 2**. Sauf cas contraire, toutes les souches bactériennes sont cultivées en milieu lysogeny broth (LB) liquide en tubes en verre pendant 18h à 37°C sous agitation (200 rpm). Si nécessaire, des antibiotiques aux concentrations suivantes sont ajoutés : streptomycine (50µg/mL), ampicilline (100µg/mL), kanamycine (50µg/mL), tétracycline (35µg/mL), spectinomycine (50µg/mL), chloramphénicol (35µg/mL), imipénème (0.25µg/mL).

Construction des mutants isogéniques

La construction des mutants isogéniques et la technique de clonage directionnel sont détaillées dans la publication n°2. Les mutants isogéniques de la souche *K. pneumoniae* CH1157 sont obtenus par la méthode de Datsenko et Wanner (Datsenko and Wanner, 2000). Brièvement, cette méthode utilise le remplacement d'un fragment génique d'intérêt par une cassette de résistance à un antibiotique (kanamycine) bordée de séquences FRT (Flipase Recognition Target) (amplifiée à partir d'un plasmide pKD4), par double recombinaison homologue. Cette cassette est ensuite excisée à l'aide d'une flipase dont le gène de structure est porté par le plasmide suicide thermosensible pCP20. Pour le remplacement du promoteur 1 natif du SST6-1 par le promoteur fort constitutif PR du phage lambda, la même technique est utilisée avec le promoteur PR comme fragment d'inactivation en lieu et place de la cassette kanamycine. La mutagénèse site-dirigée a été réalisée *in situ* en utilisant le plasmide recombinant pBAD33-ssOmpA-tle1 comme matrice, à l'aide du kit Q5 Site-Directed Mutagenesis (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) conformément aux recommandations du fabricant.

Tableau 3. Plasmides utilisés dans cette étude.

Identification	Description	Source et référence
Plasmides		
pKOBEG199	Plasmide pBAD contenant l'opéron $redY\beta\alpha$ synthétisant les protéines du phage lambda sous contrôle d'un promoteur inducible à l'arabinose, Tet ^R	(Chaveroche, 2000)
pKD4	Plasmide contenant une cassette de résistance à la kanamycine bordée de séquences FRT utilisé pour la création de mutants isogéniques, Ap ^R , Km ^R	(Datsenko and Wanner, 2000)
pCP20	Plasmide contenant le gène de la recombinase FLP, utilisé pour l'excision de la cassette kanamycine, Cm ^R , Ap ^R	(Datsenko and Wanner, 2000)
pSTAB	Plasmide dérivé d'un pZE contenant un système toxine-antitoxine flm du plasmide F, utilisé pour la transcomplémentation, Ap ^R	(Khater <i>et al.</i> , 2015)
pSTAB-tssB	pSTAB portant une copie du gène <i>tssB</i> , Ap ^R	Cette étude
pBAD33	Plasmide de clonage, inducible à l'arabinose, origine de réplication p15A, Cm ^R	(Jurénas <i>et al.</i> , 2021)
pBAD33-ssOmpA	pBAD33 portant un peptide signal périplasmique spécifique (Outer Membrane Protein A) en amont du site de multclonage, Cm ^R	Donné par E. Cascales
pBAD33-ssOmpA-tle1	pBAD33-ssOmpA portant une copie du gène <i>tle1</i> , Cm ^R	Cette étude
pBAD33-RBS	pBAD33 portant une séquence consensus RBS insérée au sein du site de multclonage, Cm ^R	(Jurénas <i>et al.</i> , 2021)
pBAD33-RBS-tle1	pBAD33-RBS portant une copie du gène <i>tle1</i> , Cm ^R	Cette étude
pZE2R-gfp	Plasmide pZE portant un gène codant la GFP sous contrôle du promoteur constitutif PR du phage lambda, Km ^R	(Da Re <i>et al.</i> , 2007)

Abréviations : Ampicilline (Ap) ; Kanamycine (Km) ; Tetracycline (Tet) ; Chloramphénicol (Cm)

Analyses bio-informatiques

L'analyse *in silico* du génome de *K. pneumoniae* CH1157 a été réalisée à partir des séquences et annotations fournies par le Genoscope (<https://mage.genoscope.cns.fr>). L'identification des différents clusters associés au SST6 a été réalisée en ligne à l'aide du logiciel VR Profile (<http://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/VRprofile/>). Enfin, l'annotation SST6 a été affinée par analyse BLASTX (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) des séquences nucléotidiques et vérification d'homologie avec les protéines SST6 déjà caractérisées dans les bases de données.

1. Modélisation 3D des effecteurs Tle1 et Tke

Pour chaque effecteur, les séquences protéiques déduites ont été récupérées en ligne (Genoscope) et les fichiers PDB (Protein Data Bank) ainsi générés (serveur Phyre2) permettent une pré-visualisation du modèle protéique par homologie de séquences avec d'autres protéines déjà modélisées dans cette base de données (modèle de Markov caché) (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>). La modélisation et l'annotation 3D des structures tridimensionnelles des protéines sont réalisées grâce au logiciel en ligne EzMol (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/ezmol/>).

2. Identification des séquences promotrices et des sites de fixation de régulateurs transcriptionnels

Les régions promotrices, ainsi que les sites potentiels de fixation des régulateurs transcriptionnels des SST6s de *K. pneumoniae* CH1157 ont été identifiés en ligne grâce au logiciel BPROM, qui permet la prédiction *in silico* de séquences promotrices bactériennes à partir de séquences nucléotidiques au format FASTA (<http://www.softberry.com/>).

Suivi de croissance en milieu liquide

Chaque pré-culture est réalisée au moins 3 fois pour permettre l'obtention d'au moins 3 réplicats biologiques, dans 5mL de milieu LB supplémenté avec 0.8% de glucose et 35µg/mL de chloramphénicol. Après incubation d'une nuit à 37°C, chaque suspension est diluée à DO_{620nm} = 0.001 dans 50 mL de milieu LB liquide contenant 0.2% d'arabinose. Le suivi de la croissance est effectué par mesure spectrophotométrique (Genesys 30) de la densité optique à 620nm (ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, USA) pendant 8h avec des points de prélèvements toutes les 30 min.

Tests de toxicité sur milieu solide

Les souches portant les constructions plasmidiques dérivées du pBAD33 sont cultivées pendant 18h dans 5mL de milieu LB supplémenté avec 0.8% de glucose et 35µg/mL de chloramphénicol. Après incubation, chaque suspension est ajustée à $D_{620\text{nm}}=0.2$ dans 1mL de sérum physiologique après un lavage au sérum physiologique, puis diluée en série au 1/10^e. Dix µL de chaque dilution sont ensuite déposés sous forme de « spot » sur boîte LB solide contenant 0.2% d'arabinose et 35µg/mL de chloramphénicol.

Microscopie électronique à transmission

Les souches portant les constructions plasmidiques dérivées du pBAD33 sont cultivées pendant 18h dans 5mL de milieu LB supplémenté avec 0.2% d'arabinose (activation transcriptionnelle) ou 0.8% de glucose (répression transcriptionnelle) et 35µg/mL de chloramphénicol. Après incubation, les cellules sont diluées en eau stérile filtrée déionisée et centrifugées directement sur grilles de cuivre (diamètres des pores : 400) recouvertes d'un film carbone Forvar, à 18 000g pendant 20mn à 14°C (Pelanne Instruments, Toulouse, FRANCE). Les cellules subissent ensuite un traitement contrastant aux sels d'uranile (2% m/m) à température ambiante pendant 30 secondes puis rincées deux fois avec de l'eau stérile filtrée déionisée avant d'être séchées sur un papier filtre. Les culots sont ensuite visualisés au microscope électronique à transmission (MET) à 80kV grossissement x20000 (Jeol JEM 2100-Plus (JEOL, Akishima, Tokyo, JAPON)).

Réaction de transcription inverse et PCR quantitative

L'ensemble des conditions testées sont répertoriées dans l'**Annexe 1**

1. Extraction des ARN : Cinq mL de culture bactérienne sont centrifugés pendant 5mn à 6000g à +4°C et le culot est repris dans 1mL de *RNAlater*® (Ambion, ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, USA). L'extraction des ARN totaux est ensuite effectuée conformément au protocole décrit par Toledo-Arana *et al.* (Toledo-Arana *et al.*, 2009). Brièvement, les bactéries sont lysées mécaniquement pendant 45 secondes en tubes « Micro-organism lysing VK01 » (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, FRANCE) avec un broyeur PreCellys 24 (Bertin Technologies). Après une première extraction au phénol acide (Ambion) et au TRIzol (ThermoScientific), les ARNs totaux sont précipités à l'isopropanol et traités avec 10 unités de TURBO DNase (Ambion). Après une seconde extraction phénol-

chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol, les culots d'ARNs sont mis en suspension dans 45µL d'eau distillée traitée au DEPC (Ambion). Les ARNs totaux sont ensuite dosés par fluorométrie grâce à l'appareil Qubit (Invitrogen, ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, USA) et l'absence d'ADN est vérifiée par PCR (Biotech Rabbit, Berlin, ALLEMAGNE) selon le protocole d'amplification : 2 mn à 98°C puis 40 cycles de 5 secondes à 98°C et 20 secondes à 59°C.

2. Transcription inverse et PCR quantitative : La rétro transcription des ARNs est réalisée à partir de 500ng d'ARNs totaux en utilisant le kit iScript cDNA Synthesis (BioRad, Hercules, Californie, USA) selon les recommandations du fabricant. Les réactions sont réalisées dans un thermocycleur T100 Thermal Cycler (BioRad) suivant le programme : 5mn à 25°C, 20mn à 46°C puis 1mn à 95°C. Les ADNc obtenus sont utilisés comme matrice pour réaliser les PCR quantitatives (qPCR).

Les qPCR sont réalisées en microplaques 96 puits avec le kit SsoAdvanced SYBR® Green Supermix (BioRad) dans un volume total de 10µL comprenant : 5µL de iQ™SYBR® Green Supermix (BioRad), 500nM de chaque amorce et 2µL d'ADNc dilué au 1/20. Les couples d'amorces utilisés pour les qPCR sont présentés en **Annexe 2**. L'efficacité de chaque couple d'amorces est déterminée par qPCR en utilisant des dilutions au dixième en série d'ADN génomique matrice issu de *K. pneumoniae* CH1157 (de 1000 à 0.1pg/µL) et a été validée à 100% pour tous les couples d'amorces. Les réactions d'amplifications sont réalisées dans un thermocycleur CFX96 Real-Time System (BioRad) avec le programme suivant : dénaturation initiale 30 sec à 95°C puis 40 cycles de 10 secondes à 98°C et 20 secondes à 60°C, mesure de fluorescence à la fin de chaque cycle d'amplification. La spécificité de chaque couple d'amorces est vérifiée en réalisant une courbe de fusion : à la fin de chaque cycle d'amplification, une mesure de la fluorescence est effectuée en continu avec une augmentation progressive de la température entre 65°C et 95°C. L'expression relative de chaque gène est ensuite calculée grâce à la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$, avec $\Delta\Delta Ct = [(Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \text{ gène de référence}) \text{ échantillon étalon}] - [(Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \text{ gène de référence}) \text{ échantillon à tester}]$ (Schmittgen and Livak, 2008). Les gènes *cpxR* et *recA* sont utilisés comme gènes de ménage et les conditions « LB 37°C » ou « MEM 37°C » sont utilisées comme conditions contrôles.

Tests de compétition inter-bactérienne

L'activité antibactérienne médiée par le SST6 a été étudiée par des approches de compétition en milieu solide (i) ou en milieu liquide (ii). Les souches de *K. pneumoniae* « attaquantes » ou ses mutants isogéniques délétés du SST6 ainsi que les bactéries « réceptrices » (*E. coli* K12 MG1655, *E. coli* K12 W3110, AIEC LF82, *E. coli* commensal murin, *Bacteroides spp.*, *F. prausnitzii*) sont cultivées pendant 18h dans le milieu de culture et avec les conditions optimales de croissance (conditions anaérobies en chambre de Freter 85% N₂, 5% CO₂ and 10% H₂ pour *Bacteroides spp.* et *F. prausnitzii*; milieu de culture : Brain Heart Infusion (BHI) liquide supplémenté en 0.2% fructose, 33mM acétate de sodium et 0.05% cystéine). Les DO_{620nm} de chaque culture sont ensuite ajustées pour obtenir un nombre d'UFC/mL équivalent entre attaquantes et réceptrices. Les bactéries attaquantes et réceptrices sont ensuite mixées en milieu liquide LB ou BHI supplémenté en ratio 5 :1 (v/v) (attaquante/réceptrice).

Pour la compétition sur milieu solide, 25µL de mélange bactérien sont déposés sur gélose LB, puis incubés pendant 5h à 37°C. Les spots sont ensuite découpés et repris dans 1 mL de sérum physiologique. Le nombre de bactéries réceptrices survivantes dans l'échantillon est quantifié après dilutions en série et dénombrement sur milieu sélectif.

Pour la compétition en milieu liquide, les mélanges bactériens sont directement incubés pendant 5h (et 24h avec *Bacteroides spp.* et *F. prausnitzii*) à 37°C. Le nombre de bactéries réceptrices survivantes dans l'échantillon est quantifié par dilutions en série et dénombrement sur milieu sélectif.

Identification des régulateurs transcriptionnels *in vitro*

La région promotrice 1 du SST6-1 est amplifiée par PCR (Q5) à partir de l'ADN génomique de la souche CH1157 (New England Biolabs) avec des amorces biotinyliées (5-Biot-Pr-T6SS1-Kp et 3-Prom-T6SS1-Kp) générant un fragment de 858bp. La biotinylation est vérifiée par SouthWestern Blot en utilisant de la streptavidine couplée à l'enzyme phosphatase alcaline. Les produits PCR sont ensuite purifiés à l'aide du kit Nucleospin Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel, Dueren, ALLEMAGNE). Avant fixation, 200µL de billes de streptavidine magnétiques (Dynabeads, Invitrogen) sont lavés trois fois avec 1mL de DNA binding buffer (DBB) (20 mM Tris-HCl pH7.5, 1M NaCl) puis resuspendus dans 2x100µL de DBB. Aux 100µL de

billes sont ajoutés 185 μ L de DBB ainsi que 15.5 μ L de produits PCR purifiés biotinylés (promoteur) ou 15.5 μ L d'eau (contrôle négatif). Après incubation pendant 1h à 25°C dans un Thermomixer à 850rpm (Eppendorf, Hambourg, ALLEMAGNE), les billes sont sélectivement récupérées avec un aimant. Celles-ci subissent alors trois lavages successifs avec 1mL de DBB puis 2 fois avec 1mL de Protein binding buffer (PBB) (20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl). Chaque échantillon (promoteur ou contrôle négatif) est ensuite mis au contact de 800 μ L d'un lysat bactérien de la souche CH1157 (obtenu par choc thermique, sonication et lyse cellulaire en tampon adapté) et incubé 1h à 25°C sur une roue tournante (850rpm). Les billes sont à nouveau lavées trois fois avec 1mL de PBB et traitées avec 20 μ L d'un tampon Laemmli concentré 2X. Les échantillons contenant les billes sont ensuite chauffés pendant 10 mn à 98°C et 10 μ L de chaque échantillon sont déposés sur un gel SDS PAGE d'acrylamide à 12.5%. Après migration, les gels sont ensuite colorés au bleu de Coomassie. L'apparition de bandes différentielles entre l'échantillon témoin sans promoteur et l'échantillon contenant le promoteur fixé aux billes magnétiques témoigne-d'une interaction entre la région promotrice et de potentiels régulateurs transcriptionnels. Les bandes ciblées sont alors excisées, et leur contenu analysé en spectrométrie de masse. Cette manipulation a été réalisée par l'équipe du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires du Dr Eric Cascales (Université Aix-Marseille).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES



Discussion et perspectives

La présence de multiples opérons SST6s au sein des génomes bactériens est très fréquente chez les bactéries Gram négatif (Boyer *et al.*, 2009; Journet and Cascales, 2016). Dans notre étude, 1 à 4 opérons apparentés au SST6 ont été identifiés au sein des 427 génomes de *Klebsiella* analysés, avec une moyenne de 1.99 opérons par génome, en accord avec les données précédentes (Li *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2017). La présence de ces multiples opérons soulève des interrogations quant à leur interdépendance, leur régulation et leur acquisition. Ainsi, l'absence de certains core gènes du SST6 dans un opéron incomplet affecte-t-elle sa capacité à produire un système fonctionnel ? Les opérons peuvent-ils se complémenter entre eux ? Aussi, l'architecture des deux opérons SST6-1 et -2 dans la souche CH1157, très conservée par rapport aux souches hypervirulentes NTUH-K2044 et HS11286 (Barbosa and Lery, 2019), correspond aux modèles majoritairement identifiés au sein de l'espèce *K. pneumoniae* (Sarris *et al.*, 2011; Barbosa and Lery, 2019). La modification du pourcentage en GC dans ces régions est en faveur d'une intégration récente par transfert horizontal (Journet and Cascales, 2016). L'acquisition de multiples clusters présentant des organisations distinctes pourrait correspondre à des phénomènes d'acquisition différents pour ces SST6s. Du fait de l'homologie de structure avec la queue contractile des bactériophages (Zoued *et al.*, 2014), l'hypothèse d'une intégration de plusieurs d'entre eux dans le génome bactérien pourrait expliquer la multiplicité des opérons SST6. Certains opérons SST6 auraient également pu être acquis par transformation, comme cela est montré chez *V. cholerae*, capable de lyser des bactéries de son environnement immédiat avec son SST6 pour ensuite intégrer une partie de leur génome (Borgeaud *et al.*, 2015). De plus, il semble que l'architecture des SST6s de *Klebsiella spp.* et la nature de leurs effecteurs soient « espèce-dépendants », mais indépendantes de l'origine géographique de la souche (Li *et al.*, 2022; Wong Fok Lung *et al.*, 2022). Plusieurs études ont montré une corrélation entre la présence d'un SST6 et l'expression d'un phénotype hypervirulent chez *K. pneumoniae*, mais également avec la présence de gènes de résistance aux antibiotiques (Liao *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2020; Wong Fok Lung *et al.*, 2022). Au même titre qu'il existe des groupes clonaux de *K. pneumoniae* considérés « à problèmes » - possédant des traits d'hypervirulence et de multi-résistance aux antibiotiques (Wyres *et al.*, 2020) - Zhou et al. confirment une surreprésentation du SST6 chez

des souches majoritairement hypervirulentes isolées de bactériémies et appartenant au séquence type ST23 (Zhou *et al.*, 2020). Notre étude n'a pas démontré d'association entre la présence de SST6 et de *rmpA* (un régulateur de production capsulaire retrouvé majoritairement chez les souches hypervirulentes), en accord avec Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2022). Le score de virulence permettant la discrimination des souches hypervirulentes et classiques n'est pas non plus corrélé à la présence du SST6 dans les 427 génomes analysés. De même, la présence de gènes conservés du SST6 a été rapportée dans la totalité des génomes des 47 isolats analysés de *K. pneumoniae* ST258, qui regroupent des clones multi-résistants aux antibiotiques (Wong Fok Lung *et al.*, 2022). Si des corrélations ont été mises en évidence entre la présence du SST6 et des caractéristiques de souches de *K. pneumoniae*, (hypervirulence, multi-résistance aux antibiotiques, séquences types spécifiques), il semble utile d'évaluer la prévalence et la nature des différents effecteurs (phospholipases, amidases, nucléases, peptidases) du SST6 de *K. pneumoniae*.

La présence du SST6 chez *K. pneumoniae* en tant que facteur de pathogénicité n'a été que très récemment identifiée (Sarris *et al.*, 2011). Ce système, jusqu'alors caractérisé chez les souches hypervirulentes, constitue une arme efficace contre des bactéries pouvant rentrer en compétition avec *K. pneumoniae*. L'activité antibactérienne médiée par le SST6 a été en effet démontrée chez la souche multirésistante HS11286 et les souches hypervirulentes Kp52.145 et NTUH-K2044 (Hsieh *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2017; Storey *et al.*, 2020). Nos résultats ont permis de mettre en évidence le rôle du SST6 dans la modulation des communautés microbiennes intestinales en modèle murin et montrent une corrélation entre la diminution des bactéries de la famille des Oscillospiraceae et la présence de *K. pneumoniae* possédant un SST6 fonctionnel. Ces espèces commensales pourraient représenter des compétiteurs de *K. pneumoniae*, ciblées spécifiquement par le SST6 au sein du microbiote intestinal. La famille des Oscillospiraceae regroupe des espèces commensales variées dont *F. prausnitzii*, une bactérie productrice de butyrate, un AGCC essentiel au maintien de l'homéostasie. Cette espèce bactérienne est bénéfique à la santé humaine du fait de ses activités anti-inflammatoires et anti-nociceptives (Miquel *et al.*, 2013). Des expériences de compétition menées *in vitro* n'ont cependant pas permis de mettre en évidence d'activité antibactérienne directe de *K. pneumoniae* envers *F. prausnitzii*, du fait de problèmes techniques liés notamment à son caractère anaérobie strict. Ainsi, des investigations complémentaires

devront être menées pour tester l'activité antibactérienne *in vitro* de *K. pneumoniae* dans des conditions de culture adaptées aux contraintes de chacun des protagonistes (anaérobiose stricte, P2) ou directement *in vivo*, en utilisant par exemple des modèles de souris gnotobiotiques. Un modèle intéressant serait le modèle Oligo-Mouse-Microbiota¹² (Oligo-MM¹²), comportant une flore contrôlée composée de 12 espèces, chacune représentative des phyla majeurs du microbiote intestinal (sept Firmicutes, deux Bacteroidetes, une souche d'Actinobactéries, une souche de Betaprotéobactéries et une souche de Verrucomicrobia) (Brugiroux *et al.*, 2016). De plus, ce modèle pourrait être adapté, en ajoutant des espèces d'intérêt comme *F. prausnitzii*. L'utilisation de cet outil permettrait d'obtenir une vue simplifiée des cibles spécifiques du SST6 de *K. pneumoniae* ou de savoir si son impact est plus global sur la richesse et la diversité du microbiote ; des analyses métabolomiques pourraient compléter cette approche en suivant des marqueurs clés comme les AGCC (butyrate, acétate, lactate, propionate). L'utilisation de systèmes de digestion *in vitro* dynamiques pourrait également permettre d'évaluer plus finement l'impact du SST6 de *K. pneumoniae* sur un microbiote complexe, par exemple le système ARCOL (Artificial Colon) ou le TIM-2, qui simule la dynamique du colon humain *via* une inoculation avec des échantillons fécaux (Dupont *et al.*, 2019).

Les commensaux du microbiote colonisant les épithélia sont capables de s'entourer de matrices exopolysaccharidiques leur permettant d'accroître leur résistance aux pathogènes, l'ensemble s'apparentant à des structures de biofilm (Yang *et al.*, 2020). La capacité de *K. pneumoniae* à former un biofilm a été largement décrite dans la littérature. Elle est médiée par un ensemble de facteurs de pathogénicité (pili, LPS, capsule) régulés intrinsèquement, mais aussi *via* des phénomènes de quorum sensing (QS). Chez plusieurs espèces, il semble exister une étroite relation entre la capacité pour une bactérie à former du biofilm et la présence des SST6s. Mais si la capacité à former du biofilm est inhibée pour des souches mutées dans les gènes du SST6 chez *Pseudomonas* et *E. coli* (Aschtgen *et al.*, 2008; de Pace *et al.*, 2011; Gallique *et al.*, 2017b), elle est augmentée chez *A. baumanii* (Dong *et al.*, 2022). Concernant *K. pneumoniae*, les souches SST6 positives ne forment pas plus ou moins de biofilm par rapport aux souches SST6 négatives (n=119) (Zhang *et al.*, 2022). La capacité à former du biofilm sur surface abiotique pour la souche CH1476 ainsi que celle de ses mutants respectifs inactivés pour la synthèse du SST6 a été testée *in vitro* (**Annexe 3**). Les résultats

obtenus après coloration au cristal violet montrent une formation de biofilm plus importante à 4h et 24h pour les souches déletées du SST6-1 comparativement aux souches contrôles, phénotype restauré par la trans-complémentation du gène *tssB*. Cependant, le nombre de bactéries viables au sein du biofilm n'est pas modifié par la mutation du SST6-1. Ainsi, le SST6-1 semble jouer un rôle dans la formation de biofilm en modulant la production de matrice d'exopolysaccharides. Pour étudier ces phénomènes, des observations en microscopie permettraient d'apprécier la structure de la matrice d'exopolysaccharides formée par CH1476 et les différents mutants du SST6 (microscopie confocale). Elles pourraient également être réalisées en temps réel, dans un système cinétique tel que le BioFlux, qui permet de plus de faire varier plusieurs paramètres pour se rapprocher des conditions retrouvées *in vivo* (présence d'un flux, température constante, microscopie en temps réel). De plus, la capacité de la souche CH1476 et des mutants invalidés dans les SST6 à former du biofilm pourrait être testée en condition « multi-espèces », c'est-à-dire dans des biofilms mixtes. Cette approche permettrait de tester l'activité antibactérienne du SST6 de *K. pneumoniae* en condition de vie biofilm, qui correspond à un profil transcriptionnel original par rapport aux autres états physiologiques de la cellule bactérienne (planctonique, biofilm, bactéries dispersées) (Guilhen *et al.*, 2016). Bien que l'expression des gènes codant les différents SST6s ne soit pas modifiée dans les bactéries sous forme de biofilm et les cellules dispersées par rapport aux bactéries planctoniques (Guilhen *et al.*, 2016), une régulation post-transcriptionnelle reste possible. Ainsi, une compétition entre les différents individus composant le biofilm mixte pourrait s'établir, comme il a déjà été montré avec le SST6 de *B. thailandensis*, qui joue un rôle crucial dans la survie de cette bactérie en biofilm mixte avec *P. putida* (Schwarz *et al.*, 2010). De plus, la mixité des espèces pouvant cohabiter au sein de biofilms polymicrobiens soulève une question importante : le SST6, s'il peut être utilisé comme arme antibactérienne, peut-il être également utilisé comme un dispositif de communication pour engager un dialogue moléculaire avec d'autres espèces ? Ce phénomène de reconnaissance, médié par le SST6, a déjà été étudié chez plusieurs espèces capables de discerner les attaques de potentiels compétiteurs des attaques d'individus « alliés » (Basler *et al.*, 2013; Basler and Mekalanos, 2012; Speare *et al.*, 2022). Storey et al. ont démontré que *K. pneumoniae* Kp52.145 perçoit les attaques du SST6 via son système senseur à deux composants PhoPQ (Storey *et al.*, 2020). En conséquence, l'activité antibactérienne médiée par le SST6 de Kp52.145 est uniquement

observée en réponse à des bactéries possédant un SST6. Ces résultats suggèrent que *K. pneumoniae* utilise son SST6 en réponse à une attaque extérieure, captée par PhoPQ, après perturbation de l'intégrité membranaire *via* le SST6 de la bactérie attaquante. Il serait intéressant de déterminer si la présence d'un SST6 chez les bactéries cibles potentielles est nécessaire à l'induction d'une riposte par *K. pneumoniae*.

La capacité antibactérienne du SST6 est liée à l'injection d'effecteurs toxiques. Les SST6 de *K. pneumoniae* CH1157 comprennent deux effecteurs toxiques potentiels (Tle1 et Tke) pouvant agir sur des cibles de nature différente. Leur effet toxique a été montré *in vitro* par des approches de clonage directionnel en système hétérologue et a permis de mettre en évidence le potentiel de chacun dans la perméabilisation des membranes bactériennes, ainsi qu'un déficit de croissance associé à leur production périplasmique. Au sein du SST6-1, un système toxine-antitoxine a été identifié ; il comporte trois gènes *tli* et un gène *tle1*. Des systèmes toxines antitoxines similaires (1 gène *tle1* pour 3 *tli*) ont été identifiés au sein d'autres clusters SST6 chez *K. pneumoniae* et d'autres espèces (*Serratia proteomaculans*, *Stenotrophomonas spp.*) (Russell *et al.*, 2013). Tle1 est une toxine universelle de type phospholipase, active sur les phospholipides membranaires de la cellule cible. Aucune activité envers les cellules eucaryotes médiée par Tle1 n'a été pour l'instant rapportée dans la littérature, mais d'autres phospholipases (de type Tle5) sécrétées par le SST6, PldB et Pld1 sont respectivement décrites comme facilitant l'invasion chez *P. aeruginosa* et la virulence de *K. pneumoniae* en modèle murin (Jiang *et al.*, 2014; Lery *et al.*, 2014). Quant à l'éventuelle action du SST6 de *K. pneumoniae* sur les cellules eucaryotes, elle reste à déterminer et pourrait jouer un rôle dans les phases de dissémination. En effet, les mécanismes moléculaires et les voies de dissémination de *K. pneumoniae*, de l'intestin vers les autres organes, restent méconnus. Outre l'hypothèse d'un passage de la bactérie par le carrefour oropharyngé, une étude a mis en évidence la capacité de translocation de souches *K. pneumoniae* isolées de bactériémies (Hsu *et al.*, 2015). Celle-ci pourrait être liée à l'action du SST6, nécessaire au processus d'invasion de cellules épithéliales intestinales Caco-2 pour la souche hypervirulente NTUH-K2044 (Hsieh *et al.*, 2019). *K. pneumoniae* CH1157 pourrait donc utiliser Tle1 pour créer une brèche dans la barrière formée par les cellules épithéliales intestinales. Pour confirmer cette hypothèse, des tests *in vitro* d'adhésion/invasion pourraient être envisagés en utilisant un tapis cellulaire constitué de cellules différencierées Caco-2 mimant au mieux l'épithélium

intestinal, et de cellules HT29-MTX productrices de mucus (ratio 70-30% respectivement). La mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) de ce tapis permettrait d'appréhender l'influence de la présence du SST6 lors de l'infection cellulaire. Ces données seraient également renforcées par la mesure des capacités de translocation de la souche CH1476 sauvage versus celle d'un mutant invalidé dans le SST6 *in vivo* dans un modèle de colonisation intestinale.

Concernant le SST6-2, un nouvel effecteur potentiel a été identifié, Tke nommé ainsi pour « Type VI *Klebsiella* effector ». Il partage des homologies de séquence avec les domaines conservés d'autres effecteurs déjà décrits dans d'autres genres bactériens. C'est le cas des amidases Tae et des metalloendopeptidases Tpe caractérisées chez *Acinetobacter* (Ringel *et al.*, 2017). Tae possède une activité antibactérienne directe contre *E. coli* en ciblant le peptidoglycane, tandis que Tpe est impliqué dans la compétition intra-espèce vis-à-vis de souches délétées du système toxine antitoxine Tpe-Tpi (Ringel *et al.*, 2017). Le domaine SLT transglycolase (PF 01464.23) retrouvé dans l'effecteur Tke est également présent chez les effecteurs du 11^e groupe de *K. pneumoniae* (toxines hydrolysant les polysaccharides) décrits par Li *et al.* (Li *et al.*, 2022). De plus, un nouvel effecteur du SST6 a été récemment mis en évidence chez *Acinetobacter baumanii* (Tse4) ; il possède les 3 domaines conservés de Tke : un domaine LysM de liaison au peptidoglycane N-terminal, un domaine transglycosylase lysozyme-like et un domaine C-terminal M23 peptidase (Le *et al.*, 2021). Tse4 est d'autant plus original qu'il est le premier effecteur avec une activité antibactérienne contre des bactéries Gram négatif et Gram positif. Les auteurs de cette étude montrent la présence d'effecteurs homologues à Tae4 au sein de plusieurs espèces bactériennes, dont *K. pneumoniae* (Le *et al.*, 2021). Le paradigme initial était que le SST6 ne pouvait cibler que des bactéries Gram négatif, les bactéries Gram positif étaient considérées comme protégées des attaques du SST6 grâce au « bouclier » formé par leur épaisse paroi (80nm), empêchant la pénétration de l'aiguille du SST6 et la diffusion des effecteurs. Pourtant, certaines espèces bactériennes, dont *K. pneumoniae*, peuvent utiliser leur SST6 pour tuer des cellules fongiques (*S. cerevisiae*, *C. albicans*) possédant une paroi encore plus épaisse (110nm) (Storey *et al.*, 2020). Ces observations suggèrent un rôle de Tke dans la compétition inter-bactérienne impliquant des bactéries Gram positif et devraient conduire à des tests de compétition interbactérienne *in vitro*. Le rôle de chacun des domaines, et notamment du domaine LysM, reste encore à

déterminer mais il pourrait être crucial dans l’ancrage de l’effecteur au peptidoglycane (Jurénas and Cascales, 2022). La délétion de ce domaine, ou une fusion de celui-ci en partie N-terminale avec un effecteur déjà caractérisé, permettrait de vérifier que l’ancrage dans le peptidoglycane bactérien *via* LysM est le facteur clé dans l’établissement d’une toxicité vis-à-vis des organismes Gram positif. Enfin, chez *A. baumanii*, l’activité enzymatique de Tse4 est augmentée en condition basique (pH=8.0) et inhibée à pH acide (6.8), et c’est une bactérie qui sécrète de la D-lysine, favorisant l’alcalisation du milieu (Le *et al.*, 2021). Chez *K. pneumoniae*, le pH environnemental pourrait également permettre d’accroître la toxicité de Tke. En effet, *K. pneumoniae* est une bactérie capable de décarboxyler la lysine grâce à la synthèse d’une lysine décarboxylase, formant des métabolites aminés alcalinisant le milieu. Les SST6-1 et -2, comportant deux toxines distinctes Tle1 et Tke, pourraient donc avoir des rôles spécifiques mais complémentaires dans l’établissement d’une compétition envers les communautés microbiennes complexes comme celle du microbiote intestinal. Tke, du fait de son homologie avec Tae4, pourrait cibler les bactéries Gram positif tandis que Tle1 ciblerait les bactéries Gram négatif et/ou les cellules de l’hôte.

La régulation de l’expression du SST6 est complexe et reste mal comprise chez *K. pneumoniae*. Si différents stress (présence de molécules antimicrobiennes, stress osmotiques, acides et oxydatifs) activent l’expression des gènes codant le SST6 de souches de *K. pneumoniae* hypervirulentes (Hsieh *et al.*, 2019; Storey *et al.*, 2020), aucune étude ne s’est intéressée à la régulation des opérons SST6s des souches classiques de *K. pneumoniae*. Barbosa et Lery ont mis en évidence *in silico* plusieurs sites de fixation de régulateurs transcriptionnels au niveau des opérons SST6s dans trois souches de référence NTUH-K2044, Kp52.145 et HS11286 (Barbosa and Lery, 2019). Parmi eux, six sont communs aux trois souches et leur nature suggère une expression du SST6 en réponse à des stress environnementaux : H-NS / variations de températures, OxyR / stress oxydatif, GcvA, Fis / stress nutritif et RcsAB, OmpR / stress osmotique (Barbosa and Lery, 2019). La délétion du gène *hns*, codant un répresseur transcriptionnel, dans la souche CH1157 a été tentée, mais sans succès ; cette mutation semble létale dans notre modèle. Plusieurs sites de fixations transcriptionnels potentiels ont été identifié *in vitro* et *in silico* dans le génome de cette souche, au niveau du promoteur du SST6-1 (ArgR, Fnr, LexA). Bien que les opérons SST6-1 et -2 soient fortement homologues aux opérons SST6s des souches NTUH-K2044 et HS11286, leur

régulation transcriptionnelle pourrait être différente. Cependant, l'impact du SST6-1 de la souche CH1157 sur le microbiote intestinal en modèle murin atteste de son activité dans des conditions *in vivo* retrouvées au niveau du tractus digestif. Ainsi, différentes conditions de culture (mimant le tractus digestif ou inspirées de la littérature) ont été testées *in vitro* pour évaluer leur rôle sur l'expression des gènes codant les SST6 (RT-qPCR). Ces résultats préliminaires ont permis de montrer l'activation du SST6-1 dans 3 conditions :

i) en présence de molécules antibactériennes comme les antibiotiques (imipénème). Cette donnée est en accord avec les résultats obtenus par Liu et al. qui montrent que le SST6 d'une souche *K. pneumoniae* HS11286 est actif en présence de β-lactamines (ceftazidime, méropénème) et apramycine (Liu et al., 2017). Ces résultats sont à mettre en lien avec les observations cliniques. En effet, l'antibiothérapie est le principal facteur en cause pour le développement d'une dysbiose, qui elle-même favorise la survenue d'infection chez l'hôte colonisé par *K. pneumoniae* (Lange et al., 2016). En plus de l'abolition de la résistance à la colonisation du microbiote intestinal, le traitement antibiotique favoriserait l'expression du SST6 de *Klebsiella*, permettant ainsi d'accroître sa virulence et son pouvoir de dissémination.

ii) en présence de stress mimant ceux rencontrés au niveau du tractus digestif (milieux conditionnés par la présence de cellules TC7 ou addition de sels biliaires). Là encore, cette observation est en accord avec les données de la littérature. En effet, une surexpression du gène *hcp* est observée lors d'une co-incubation de la souche *K. pneumoniae* NTUH-K2044 avec des cellules épithéliales intestinales Caco-2 (Hsieh et al., 2019). Dans notre étude, l'expression du gène *tssB* est également augmentée lorsque *K. pneumoniae* CH1157 est cultivée soit dans un milieu conditionné par la présence de cellules épithéliales intestinales TC7, soit en présence de sels biliaires. A noter que les sels biliaires (acide cholique et désoxycholique) sont également capables de stimuler l'expression du gène *tssB* du SST6-1 chez *S. Typhimurium* (Sana et al., 2016b). L'activation *in vitro* du SST6-1 par des conditions environnementales mimant l'*in vivo* du tractus digestif reste cependant à vérifier en modèle animal. Une première approche consisterait à réaliser un suivi de souches rendues immunofluorescentes, sauvages versus mutants de SST6, via l'observation de cryosections de colon de souris infectées. L'utilisation d'un modèle dynamique mimant les conditions du tractus digestif tel que le système TIM pourrait également représenter une bonne alternative *in vitro* afin d'étudier

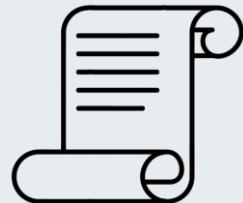
l'expression des gènes codant le SST6. En effet, l'intégralité des conditions du tractus gastro-intestinal (sain ou pathologique) peut être contrôlée comme la température, le pH ou encore la présence des fluides gastriques (Dupont *et al.*, 2019).

iii) en présence d'arginine, l'expression du gène *tssB* est également augmentée. Cette observation est cohérente et renforcée par l'identification d'un site de fixation pour le régulateur ArgR au niveau du promoteur du SST6-1. Chez *S. Typhimurium*, les SST3-1 et -2 (SPI-1 et -2) - dont le fonctionnement ressemble à celui du SST6 - sont impliqués dans l'invasion des cellules eucaryotes (Ibarra and Steele-Mortimer, 2009). Ces SST3 sont régulés par la présence de polyamines, notamment la spermidine et la putrescine pour lesquelles l'expression des gènes de structure est augmentée au contact de cellules épithéliales et de macrophages (Di Martino *et al.*, 2013). Ces deux polyamines sont synthétisées à partir de précurseurs acides aminés, notamment l'arginine, et elles sont essentielles au processus d'invasion de cellules épithéliales et à la virulence en modèle murin (Jelsbak *et al.*, 2012). Une régulation similaire pourrait être envisagée pour le SST6 de *K. pneumoniae*, où l'arginine en tant que précurseur de polyamines permettrait d'augmenter le potentiel anti-eucaryote et/ou procaryote médiée par le SST6, *via* la production de ces polyamines. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en créant un mutant isogénique déléte du gène *speA* codant l'arginine décarboxylase impliquée dans la biosynthèse de la putrescine et de la spermidine, et en déterminant les phénotypes d'adhésion/invasion sur cellules épithéliales de ce mutant.

Dans ce travail, nous avons démontré le rôle du SST6-1 de la souche classique de *K. pneumoniae* CH1476 dans la colonisation intestinale à long terme. Mais *K. pneumoniae* est un pathogène à tropisme respiratoire ; la même approche pourrait être envisagée dans un modèle d'infection pulmonaire, par exemple par instillation nasale chez des souris. Il serait alors intéressant de déterminer l'impact des différents SST6s de *K. pneumoniae* sur la composition du microbiote pulmonaire résident et le comportement des cellules de l'hôte, notamment les macrophages circulants. Le rôle du SST6 dans l'échappement phagolysosomal a été démontré dans d'autres modèles bactériens comme *F. tularensis* qui sécrète un effecteur OpiA de façon SST6-dépendante lui permettant d'accroître sa survie en macrophages par un échappement cytoplasmique (Eshraghi *et al.*, 2016; Ledvina *et al.*, 2018). *In fine*, la complexité d'éradication des infections engendrées par *K. pneumoniae*, en lien

notamment avec son niveau élevé de résistance aux antibiotiques, nécessite de trouver des alternatives thérapeutiques. L'inoculation de souches atténuées dans leur virulence pour prévenir l'infection par *K. pneumoniae*, sur le principe de la vaccination, représente une piste intéressante (Joseph *et al.*, 2021). Ainsi des mutants de *K. pneumoniae* délétés des opérons SST6s pourraient être administrés à des souris pour tester leur effet protecteur vis-à-vis de la colonisation par la souche sauvage. L'inoculation de protéines recombinantes du SST6 a également fait ses preuves *in vivo* en tant que stratégie prophylactique en modèle murin. En effet, l'immunisation sous cutanée de souris BALB/c par une protéine VgrG recombinante d'*A. baumanii* permet la production d'IgG anti-VgrG, augmentant la survie, le score histologique et réduisant l'inflammation et la charge bactérienne dans les organes des animaux après infection intrapéritonéale par une dose létale de la souche sauvage *A. baumannii* ATCC 19606 (Alipouri *et al.*, 2022; Pazoki *et al.*, 2021). Enfin, l'administration de xénobiotiques ciblant spécifiquement les SST6s serait une alternative thérapeutique. Cherrak *et al.* ont ainsi récemment développé un peptide cyclique biomimétique se liant à TssK, ce qui bloque *in vitro* le recrutement de TssEFG et donc la formation de la plaque de base chez les EAEC, un processus essentiel à la mise en place du SST6 (Cherrak *et al.*, 2021). Mais si le SST6 représente une cible potentielle intéressante pour lutter contre des pathogènes, la présence de systèmes apparentés dans des souches commensales voire bénéfiques est un obstacle majeur (Do *et al.*, 2017). La capacité d'une souche commensale de *B. fragilis* à utiliser un SST6 pour se défendre contre son homologue pathogène entérotoxinogène contribue à la résistance à la colonisation intestinale par ce dernier en modèle murin (Hecht *et al.*, 2016). Les gènes codant les SST6 pourraient alors être utilisés par les bactéries commensales pour cibler spécifiquement les bactéries pathogènes afin de protéger l'hôte contre leur colonisation. Ces probiotiques modifiés représenteraient alors une alternative thérapeutique efficace dans l'éradication des infections.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Références bibliographiques

- Ahmad, S., Wang, B., Walker, M.D., Tran, H.-K.R., Stogios, P.J., Savchenko, A., Grant, R.A., McArthur, A.G., Laub, M.T., and Whitney, J.C. 2019. An interbacterial toxin inhibits target cell growth by synthesizing (p)ppApp. *Nature* 575, 674–678.
- Alcoforado Diniz, J., Liu, Y.-C., and Coulthurst, S.J. 2015. Molecular weaponry: diverse effectors delivered by the Type VI secretion system: Type VI secretion system effectors. *Cell Microbiol* 17, 1742–1751.
- Ali, S.S., Xia, B., Liu, J., and Navarre, W.W. 2012. Silencing of foreign DNA in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 15, 175–181.
- Alipouri, S., Rasooli, I., Ghaini, M.H., Jahangiri, A., Darvish Alipour Astaneh, S., and Ramezanalizadeh, F. 2022. Immunity induced by valine-glycine repeat protein G imparts histoprotection of vital body organs against *Acinetobacter baumannii*. *J Genet Eng Biotechnol* 20, 42.
- Alteri, C.J., Himpsl, S.D., Pickens, S.R., Lindner, J.R., Zora, J.S., Miller, J.E., Arno, P.D., Straight, S.W., and Mobley, H.L.T. 2013. Multicellular Bacteria Deploy the Type VI Secretion System to Preemptively Strike Neighboring Cells. *PLoS Pathog* 9, e1003608.
- Alteri, C.J., Himpsl, S.D., Zhu, K., Hershey, H.L., Musili, N., Miller, J.E., and Mobley, H.L.T. 2017. Subtle variation within conserved effector operon gene products contributes to T6SS-mediated killing and immunity. *PLoS Pathog* 13, e1006729.
- Alvarez-Martinez, C.E., and Christie, P.J. 2009. Biological Diversity of Prokaryotic Type IV Secretion Systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 73, 775–808.
- Anderson, M.C., Vonaesch, P., Saffarian, A., Marteyn, B.S., and Sansonetti, P.J. 2017. *Shigella sonnei* Encodes a Functional T6SS Used for Interbacterial Competition and Niche Occupancy. *Cell Host Microbe* 21, 769–776.e3.
- Anderson, R.C., Cookson, A.L., McNabb, W.C., Kelly, W.J., and Roy, N.C. 2010. *Lactobacillus plantarum* DSM 2648 is a potential probiotic that enhances intestinal barrier function. *FEMS Microbiology Letters* 309, 184–192.
- Arias, C.A., and Murray, B.E. 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 10, 266–278.
- Aron-Wisnewsky, J., Vigliotti, C., Witjes, J., Le, P., Holleboom, A.G., Verheij, J., Nieuwdorp, M., and Clément, K. 2020. Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17, 279–297.
- Aschtgen, M., Zoued, A., Lloubès, R., Journet, L., and Cascales, E. 2012. The C-tail anchored TssL subunit, an essential protein of the enteroaggregative *Escherichia coli* Sci-1 Type VI secretion system, is inserted by YidC. *MicrobiologyOpen* 1, 71–82.
- Aschtgen, M.-S., Bernard, C.S., De Bentzmann, S., Lloubès, R., and Cascales, E. 2008. SciN Is an Outer Membrane Lipoprotein Required for Type VI Secretion in Enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190, 7523–7531.
- Aschtgen, M.-S., Gavioli, M., Dessen, A., Lloubès, R., and Cascales, E. 2010a. The SciZ protein anchors the enteroaggregative *Escherichia coli* Type VI secretion system to the cell wall. *Mol Microbiol* 75, 886–899.
- Aschtgen, M.-S., Thomas, M.S., and Cascales, E. 2010b. Anchoring the type VI secretion system to the peptidoglycan: TssL, TagL, TagP... what else? *Virulence* 1, 535–540.

Références bibliographiques

- Aubert, D.F., Xu, H., Yang, J., Shi, X., Gao, W., Li, L., Bisaro, F., Chen, S., Valvano, M.A., and Shao, F. 2016. A *Burkholderia* Type VI Effector Deamidates Rho GTPases to Activate the Pyrin Inflammasome and Trigger Inflammation. *Cell Host Microbe* 19, 664–674.
- Aumeran, C., Poincloux, L., Souweine, B., Robin, F., Laurichesse, H., Baud, O., Bommelaer, G., and Traoré, O. 2010. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* outbreak after endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Endoscopy* 42, 895–899.
- Bachmann, V., Kostiuk, B., Unterweger, D., Diaz-Satizabal, L., Ogg, S., and Pukatzki, S. 2015. Bile Salts Modulate the Mucin-Activated Type VI Secretion System of Pandemic *Vibrio cholerae*. *PLoS Negl Trop Dis* 9, e0004031.
- Bagley, S.T. 1985. Habitat Association of *Klebsiella* Species. *Infect Control Hosp Epidemiol* 6, 52–58.
- Bagley, S.T., and Seidler, R.J. 1978. Comparative pathogenicity of environmental and clinical *Klebsiella*. *Health Lab Sci* 15, 104–111.
- Baldelli, V., Scaldaferri, F., Putignani, L., and Del Chierico, F. 2021. The Role of *Enterobacteriaceae* in Gut Microbiota Dysbiosis in Inflammatory Bowel Diseases. *Microorganisms* 9, 697.
- Bales, P.M., Renke, E.M., May, S.L., Shen, Y., and Nelson, D.C. 2013. Purification and Characterization of Biofilm-Associated EPS Exopolysaccharides from ESKAPE Organisms and Other Pathogens. *PLoS One* 8, e67950.
- 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. *Environ Microbiol* 10, 685–701.
- 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.
- Ballister, E.R., Lai, A.H., Zuckermann, R.N., Cheng, Y., and Mougous, J.D. 2008. *In vitro* self-assembly of tailorabile nanotubes from a simple protein building block. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3733–3738.
- Barbier, E., Rodrigues, C., Depret, G., Passet, V., Gal, L., Piveteau, P., and Brisse, S. 2020. The ZKIR Assay, a Real-Time PCR Method for the Detection of *Klebsiella pneumoniae* and Closely Related Species in Environmental Samples. *Appl Environ Microbiol* 86, e02711-19.
- Barbosa, V.A.A., and Lery, L.M.S. 2019. Insights into *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system transcriptional regulation. *BMC Genomics* 20.
- Basler, M. 2015. Type VI Secretion System: secretion by a contractile nanomachine. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370, 20150021.
- Basler, M., Ho, B.T., and Mekalanos, J.J. 2013. Tit-for-tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. *Cell* 152, 884–894.
- Basler, M., and Mekalanos, J.J. 2012. Type 6 secretion dynamics within and between bacterial cells. *Science* 337, 815.
- Basler, M., Pilhofer, M., Henderson, G.P., Jensen, G.J., and Mekalanos, J.J. 2012. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature* 483, 182–186.
- Beckwith, J. 2013. The Sec-dependent pathway. *Res Microbiol* 164, 497–504.

Références bibliographiques

- Bender, H., and Wallenfels, K. 1966. Pullulanase (an amylopectin and glycogen debranching enzyme) from *Aerobacter aerogenes*, pp. 555–559. Methods in Enzymology, Complex Carbohydrates. Academic Press.
- Berg, B. van den, Clemons, W.M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C., and Rapoport, T.A. 2004. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427, 36–44.
- Bernal, P., Allsopp, L.P., Filloux, A., and Llamas, M.A. 2017. The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens. *ISME J* 11, 972–987.
- Bernal, P., Llamas, M.A., and Filloux, A. 2018. Type VI secretion systems in plant-associated bacteria: T6SS in phytobacteria. *Environ Microbiol* 20, 1–15.
- Bernard, C.S., Brunet, Y.R., Gueguen, E., and Cascales, E. 2010. Nooks and Crannies in Type VI Secretion Regulation. *J Bacteriol* 192, 3850–3860.
- Bertrand, X., Dufour, V., Millon, L., Beuvier, E., Gbaguidi-Haore, H., Piarroux, R., Vuitton, D. a., and Talon, D. 2007. Effect of cheese consumption on emergence of antimicrobial resistance in the intestinal microflora induced by a short course of amoxicillin-clavulanic acid. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1052–1059.
- Bialek-Davenet, S. et al. 2014. Genomic Definition of Hypervirulent and Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clonal Groups. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1812–1820.
- Bingle, L.E., Bailey, C.M., and Pallen, M.J. 2008. Type VI secretion: a beginner's guide. *Current Opinion in Microbiology* 11, 3–8.
- Bleves, S., Sana, T.G., and Voulhoux, R. 2014. The target cell genus does not matter. *Trends in Microbiology* 22, 304–306.
- Bocian-Ostrzycka, K.M., Grzeszczuk, M.J., Banaś, A.M., and Jaguszyn-Krynicka, E.K. 2017. Bacterial thiol oxidoreductases — from basic research to new antibacterial strategies. *Appl Microbiol Biotechnol* 101, 3977–3989.
- Bondage, D.D., Lin, J.-S., Ma, L.-S., Kuo, C.-H., and Lai, E.-M. 2016. VgrG C terminus confers the type VI effector transport specificity and is required for binding with PAAR and adaptor–effector complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, E3931–E3940.
- Borgeaud, S., Metzger, L.C., Scignari, T., and Blokesch, M. 2015. The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer. *Science* 347, 63–67.
- Bose, N., Payne, S.M., and Taylor, R.K. 2002. Type 4 Pilus Biogenesis and Type II-Mediated Protein Secretion by *Vibrio cholerae* Occur Independently of the TonB-Facilitated Proton Motive Force. *J Bacteriol* 184, 2305–2309.
- Bouteiller, M. et al. 2020. Crosstalk between the Type VI Secretion System and the Expression of Class IV Flagellar Genes in the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 Strain. *Microorganisms* 8, E622.
- Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y., and Attree, I. 2009. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics* 10, 104.
- Brackmann, M., Wang, J., and Basler, M. 2018. Type VI secretion system sheath inter-subunit interactions modulate its contraction. *EMBO Rep* 19, 225–233.
- 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.

Références bibliographiques

- Brodmann, M., Dreier, R.F., Broz, P., and Basler, M. 2017. *Francisella* requires dynamic type VI secretion system and ClpB to deliver effectors for phagosomal escape. *Nat Commun* 8, 15853.
- Bröms, J.E., Ishikawa, T., Wai, S.N., and Sjöstedt, A. 2013. A functional VipA-VipB interaction is required for the type VI secretion system activity of *Vibrio cholerae* O1 strain A1552. *BMC Microbiol* 13, 96.
- Brooks, T.M., Unterweger, D., Bachmann, V., Kostiuk, B., and Pukatzki, S. 2013. Lytic Activity of the *Vibrio cholerae* Type VI Secretion Toxin VgrG-3 Is Inhibited by the Antitoxin Tsab. *J Biol Chem* 288, 7618–7625.
- Brown, C., and Seidler, R.J. 1973. Potential Pathogens in the Environment: *Klebsiella pneumoniae*, a Taxonomic and Ecological Enigma1. *Appl Microbiol* 25, 900–904.
- Brugiroux, S. et al. 2016. Genome-guided design of a defined mouse microbiota that confers colonization resistance against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Nat Microbiol* 2, 1–12.
- Brunet, Y.R., Bernard, C.S., and Cascales, E. 2020. Fur-Dam Regulatory Interplay at an Internal Promoter of the Enteropathogenic *Escherichia coli* Type VI Secretion sci1 Gene Cluster. *J Bacteriol* 202, e00075-20.
- Brunet, Y.R., Bernard, C.S., Gavioli, M., Lloubès, R., and Cascales, E. 2011. An Epigenetic Switch Involving Overlapping Fur and DNA Methylation Optimizes Expression of a Type VI Secretion Gene Cluster. *PLoS Genet* 7, e1002205.
- Brunet, Y.R., Espinosa, L., Harchouni, S., Mignot, T., and Cascales, E. 2013. Imaging Type VI Secretion-Mediated Bacterial Killing. *Cell Reports* 3, 36–41.
- Brunet, Y.R., Hénin, J., Celia, H., and Cascales, E. 2014. Type VI secretion and bacteriophage tail tubes share a common assembly pathway. *EMBO Rep* 15, 315–321.
- Brunet, Y.R., Khodr, A., Logger, L., Aussel, L., Mignot, T., Rimsky, S., and Cascales, E. 2015a. H-NS Silencing of the *Salmonella* Pathogenicity Island 6-Encoded Type VI Secretion System Limits *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Interbacterial Killing. *Infect Immun* 83, 2738–2750.
- Brunet, Y.R., Zoued, A., Boyer, F., Douzi, B., and Cascales, E. 2015b. The Type VI Secretion TssEFGK-VgrG Phage-Like Baseplate Is Recruited to the TssJLM Membrane Complex via Multiple Contacts and Serves As Assembly Platform for Tail Tube/Sheath Polymerization. *PLoS Genet* 11, e1005545.
- Burkinshaw, B.J., Liang, X., Wong, M., Le, A.N.H., Lam, L., and Dong, T.G. 2018. A type VI secretion system effector delivery mechanism dependent on PAAR and a chaperone–co-chaperone complex. *Nat Microbiol* 3, 632–640.
- Burts, M.L., Williams, W.A., DeBord, K., and Missiakas, D.M. 2005. EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 1169–1174.
- Cabezón, E., Ripoll-Rozada, J., Peña, A., de la Cruz, F., and Arechaga, I. 2014. Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiol Rev* 39, 81–95.
- Carpenter, B.M., Whitmire, J.M., and Merrell, D.S. 2009. This Is Not Your Mother's Repressor: the Complex Role of Fur in Pathogenesis. *Infect Immun* 77, 2590–2601.
- Cascales, E., and Cambillau, C. 2012. Structural biology of type VI secretion systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 1102–1111.

Références bibliographiques

- Chagnot, C., Zorgani, M.A., Astruc, T., and Desvaux, M. 2013. Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Front Microbiol* 4.
- Chandran Darbari, V., and Waksman, G. 2015. Structural Biology of Bacterial Type IV Secretion Systems. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 603–629.
- Chapon, C., and Raibaud, O. 1985. Structure of Two Divergent Promoters Located in Front of the Gene Encoding Pullulanase in *Klebsiella pneumoniae* and Positively Regulated by the maltT Product. *J Bacteriol* 164, 7.
- Chatzi, K.E., Sardis, M.F., Karamanou, S., and Economou, A. 2013. Breaking on through to the other side: protein export through the bacterial Sec system. *Biochem* 449, 25–37.
- Chatzidaki-Livanis, M., Geva-Zatorsky, N., and Comstock, L.E. 2016. *Bacteroides fragilis* type VI secretion systems use novel effector and immunity proteins to antagonize human gut Bacteroidales species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 3627–3632.
- Chaveroche, M.-K. 2000. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* 28, 97e–997.
- Chelakkot, C., Ghim, J., and Ryu, S.H. 2018. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med* 50, 1–9.
- Chen, H., Yang, D., Han, F., Tan, J., Zhang, L., Xiao, J., Zhang, Y., and Liu, Q. 2017. The Bacterial T6SS Effector EvpP Prevents NLRP3 Inflammasome Activation by Inhibiting the Ca²⁺-Dependent MAPK-Jnk Pathway. *Cell Host Microbe* 21, 47–58.
- Cherrak, Y. et al. 2018. Biogenesis and structure of a type VI secretion baseplate. *Nat Microbiol* 3, 1404–1416.
- Cherrak, Y. et al. 2021. Inhibiting Type VI Secretion System Activity with a Biomimetic Peptide Designed To Target the Baseplate Wedge Complex. *mBio* 12, e0134821.
- Cherrak, Y., Flaugnatti, N., Durand, E., Journet, L., and Cascales, E. 2019. Structure and Activity of the Type VI Secretion System. *Microbiol Spectr* 7, 7.4.11.
- Chiang, M.-K., Hsiao, P.-Y., Liu, Y.-Y., Tang, H.-L., Chiou, C.-S., Lu, M.-C., and Lai, Y.-C. 2021. Two ST11 *Klebsiella pneumoniae* strains exacerbate colorectal tumorigenesis in a colitis-associated mouse model. *Gut Microbes* 13, 1980348.
- Chou, H.-C., Lee, C.-Z., Ma, L.-C., Fang, C.-T., Chang, S.-C., and Wang, J.-T. 2004. Isolation of a Chromosomal Region of *Klebsiella pneumoniae* Associated with Allantoin Metabolism and Liver Infection. *Infect Immun* 72, 3783–3792.
- Christie, P.J., and Cascales, E. 2005. Structural and dynamic properties of bacterial Type IV secretion systems (Review). *Mol. Membr. Biol.* 22, 51–61.
- Chung, D.R. 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.
- Cianciotto, N.P. 2013. Type II Secretion and *Legionella* Virulence, pp. 81–102. In Hilbi, H., ed, Molecular Mechanisms in *Legionella* Pathogenesis, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Cianfanelli, F.R., Alcoforado Diniz, J., Guo, M., De Cesare, V., Trost, M., and Coulthurst, S.J. 2016. VgrG and PAAR Proteins Define Distinct Versions of a Functional Type VI Secretion System. *PLoS Pathog* 12, e1005735.

Références bibliographiques

- Cooper, R.M., Tsimring, L., and Hasty, J. 2017. Inter-species population dynamics enhance microbial horizontal gene transfer and spread of antibiotic resistance. *Elife* 6, e25950.
- Cotter, P. 2011. Molecular syringes scratch the surface. *Nature* 475, 301–303.
- 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.
- Coulthurst, S. 2019. The Type VI secretion system: a versatile bacterial weapon. *Microbiology* 165, 503–515.
- Coulthurst, S.J. 2013. The Type VI secretion system – a widespread and versatile cell targeting system. *Res Microbiol* 164, 640–654.
- Coyne, M.J., and Comstock, L.E. 2019. Type VI Secretion Systems and the Gut Microbiota. *Microbiol Spectr* 7, 7.2.03.
- Coyne, M.J., Roelofs, K.G., and Comstock, L.E. 2016. Type VI secretion systems of human gut Bacteroidales segregate into three genetic architectures, two of which are contained on mobile genetic elements. *BMC Genomics* 17, 58.
- Da Re, S., Le Quere, B., Ghigo, J.-M., and Beloin, C. 2007. Tight Modulation of *Escherichia coli* Bacterial Biofilm Formation through Controlled Expression of Adhesion Factors. *Appl Environ Microbiol* 73, 3391–3403.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., and Colombel, J.F. 1998. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115, 1405–1413.
- Das, S., and Chaudhuri, K. 2003. Identification of a unique IAHP (IcmF associated homologous proteins) cluster in *Vibrio cholerae* and other proteobacteria through *in silico* analysis. *In Silico Biol* 3, 287–300.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6640–6645.
- Dausset, C. et al. 2020. Identification of sulfur components enhancing the anti-Candida effect of *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35. *Sci Rep* 10, 17074.
- Davies, D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2, 114–122.
- De La Cruz, F., Frost, L.S., Meyer, R.J., and Zechner, E.L. 2010. Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34, 18–40.
- Decoin, V., Barbey, C., Bergeau, D., Latour, X., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., and Merieau, A. 2014. A type VI secretion system is involved in *Pseudomonas fluorescens* bacterial competition. *PLoS One* 9, e89411.
- Decoin, V., Gallique, M., Barbey, C., Le Mauff, F., Poc, C.D., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., and Merieau, A. 2015. A *Pseudomonas fluorescens* type 6 secretion system is related to mucoidy, motility and bacterial competition. *BMC Microbiol* 15, 72.
- Desvaux, M., Hébraud, M., Talon, R., and Henderson, I.R. 2009. Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol* 17, 139–145.
- Dethlefsen, L., and Relman, D.A. 2011. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 4554–4561.

- 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.
- Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P.A.D., and Brisse, S. 2005. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. *J Clin Microbiol* 43, 4178–4182.
- Dienes, L. 1947. Further observations on the reproduction of bacilli from large bodies in *Proteus* cultures. *Proc Soc Exp Biol Med* 66, 97.
- Dienes, L. 1946. Reproductive processes in *Proteus* cultures. *Proc Soc Exp Biol Med* 63, 265–270.
- Dieterich, W., Schink, M., and Zopf, Y. 2018. Microbiota in the Gastrointestinal Tract. *Medical Sciences* 6, 116.
- Do, J., Zafar, H., and Saier, M.H. 2017. Comparative genomics of transport proteins in probiotic and pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains. *Microb Pathog* 107, 106–115.
- Donaldson, G.P., Lee, S.M., and Mazmanian, S.K. 2016. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* 14, 20–32.
- Dong, J.-F., Liu, C.-W., Wang, P., Li, L., and Zou, Q.-H. 2022. The type VI secretion system in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and its roles in antimicrobial resistance acquisition. *Microbial Pathogenesis* 169, 105668.
- Dong, T.G., Ho, B.T., Yoder-Himes, D.R., and Mekalanos, J.J. 2013. Identification of T6SS-dependent effector and immunity proteins by Tn-seq in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 2623–2628.
- Donskey, C.J., Chowdhry, T.K., Hecker, M.T., Hoyen, C.K., Hanrahan, J.A., Hujer, A.M., Hutton-Thomas, R.A., Whalen, C.C., Bonomo, R.A., and Rice, L.B. 2000. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N Engl J Med* 343, 1925–1932.
- Douzi, B., Brunet, Y.R., Spinelli, S., Lensi, V., Legrand, P., Blangy, S., Kumar, A., Journet, L., Cascales, E., and Cambillau, C. 2016. Structure and specificity of the Type VI secretion system ClpV-TssC interaction in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Sci Rep* 6.
- Dupont, D. et al. 2019. Can dynamic *in vitro* digestion systems mimic the physiological reality? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59, 1546–1562.
- Durand, E. et al. 2015. Biogenesis and structure of a type VI secretion membrane core complex. *Nature* 523, 555–560.
- Durand, E., Cambillau, C., Cascales, E., and Journet, L. 2014. VgrG, Tae, Tle, and beyond: the versatile arsenal of Type VI secretion effectors. *Trends Microbiol* 22, 498–507.
- Dutta, P., Jijumon, A.S., Mazumder, M., Dileep, D., Mukhopadhyay, A.K., Gourinath, S., and Maiti, S. 2019. Presence of actin binding motif in VgrG-1 toxin of *Vibrio cholerae* reveals the molecular mechanism of actin cross-linking. *International Journal of Biological Macromolecules* 133, 775–785.
- Edberg, S.C. 1986. Phenotypic Characteristics of Coliform and Noncoliform Bacteria from a Public Water Supply Compared with Regional and National Clinical Species. *Appl Environ Microbiol* 52, 5.
- Eijkelkamp, B.A., Stroehner, U.H., Hassan, K.A., Elbourne, L.D.H., Paulsen, I.T., and Brown, M.H. 2013. H-NS plays a role in expression of *Acinetobacter baumannii* virulence features. *Infect Immun* 81, 2574–2583.

- Elhosseiny, N.M., El-Tayeb, O.M., Yassin, A.S., Lory, S., and Attia, A.S. 2016. The secretome of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 type II secretion system reveals a novel plasmid encoded phospholipase that could be implicated in lung colonization. *International Journal of Medical Microbiology* 306, 633–641.
- Eshraghi, A. et al. 2016. Secreted Effectors Encoded within and outside of the *Francisella* Pathogenicity Island Promote Intramacrophage Growth. *Cell Host & Microbe* 20, 573–583.
- Faber, F. et al. 2016. Host-mediated sugar oxidation promotes post-antibiotic pathogen expansion. *Nature* 534, 697–699.
- Faïs, T., Delmas, J., Barnich, N., Bonnet, R., and Dalmasso, G. 2018. Colibactin: More Than a New Bacterial Toxin. *Toxins* 10, 151.
- Falomir, M.P., Gozalbo, D., and Rico, H. 2010. Coliform bacteria in fresh vegetables: from cultivated lands to consumers. 8.
- 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. *Clin Infect Dis* 45, 284–293.
- Felisberto-Rodrigues, C., Durand, E., Aschtgen, M.-S., Blangy, S., Ortiz-Lombardia, M., Douzi, B., Cambillau, C., and Cascales, E. 2011. Towards a Structural Comprehension of Bacterial Type VI Secretion Systems: Characterization of the TssJ-TssM Complex of an *Escherichia coli* Pathovar. *PLoS Pathog* 7, e1002386.
- Feng, W., Liu, J., Ao, H., Yue, S., and Peng, C. 2020. Targeting gut microbiota for precision medicine: Focusing on the efficacy and toxicity of drugs. *Theranostics* 10, 11278.
- Flaughnatti, N. et al. 2016. A phospholipase A1 antibacterial Type VI secretion effector interacts directly with the C-terminal domain of the VgrG spike protein for delivery. *Mol Microbiol* 99, 1099–1118.
- Flaughnatti, N. et al. 2021. Human commensal gut Proteobacteria withstand type VI secretion attacks through immunity protein-independent mechanisms. *Nat Commun* 12, 5751.
- Flaughnatti, N. et al. 2020. Structural basis for loading and inhibition of a bacterial T6SS phospholipase effector by the VgrG spike. *EMBO J* 39, e104129.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 14, 563–575.
- Fortune, S.M., Jaeger, A., Sarracino, D.A., Chase, M.R., Sasetti, C.M., Sherman, D.R., Bloom, B.R., and Rubin, E.J. 2005. Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 10676–10681.
- Francetic, O., Belin, D., Badaut, C., and Pugsley, A.P. 2000. Expression of the endogenous type II secretion pathway in *Escherichia coli* leads to chitinase secretion. *EMBO J* 19, 6697–6703.
- Franchi, L., Kamada, N., Nakamura, Y., Burberry, A., Kuffa, P., Suzuki, S., Shaw, M.H., Kim, Y.-G., and Núñez, G. 2012. NLRC4-driven production of IL-1 β discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense. *Nat Immunol* 13, 449–456.
- Freudl, R. 2013. Leaving home ain't easy: protein export systems in Gram-positive bacteria. *Res Microbiol* 11.
- Friedlaender, C. 1882. Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin* 87, 319–324.

Références bibliographiques

- Fronzes, R., Christie, P.J., and Waksman, G. 2009. The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 7, 703–714.
- Fu, Y., Waldor, M.K., and Mekalanos, J.J. 2013. Tn-Seq analysis of *Vibrio cholerae* intestinal colonization reveals a role for T6SS-mediated antibacterial activity in the host. *Cell Host Microbe* 14, 652–663.
- Fukuda, S. et al. 2011. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469, 543–547.
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Stoodley, P. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology* 13, 34–40.
- Gallegos-Monterrosa, R., and Coulthurst, S.J. 2021. The ecological impact of a bacterial weapon: microbial interactions and the Type VI secretion system. *FEMS Microbiol Rev* 45, fuab033.
- Gallique, M., Bouteiller, M., and Merieau, A. 2017a. The Type VI Secretion System: A Dynamic System for Bacterial Communication? *Front Microbiol* 8.
- Gallique, M., Decoin, V., Barbey, C., Rosay, T., Feuilloy, M.G.J., Orange, N., and Merieau, A. 2017b. Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 Type VI Secretion System to Biofilm Formation. *PLoS One* 12.
- Ghigo, J.-M. 2001. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 412, 4.
- Gill, S.R., Pop, M., DeBoy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M., and Nelson, K.E. 2006. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science* 312, 1355–1359.
- Gomaa, E.Z. 2020. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek* 113, 2019–2040.
- Gonzalez-Ferrer, S., Peñaloza, 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.
- Gonzalez-Rivera, C., Bhatty, M., and Christie, P.J. 2016. Mechanism and Function of Type IV Secretion During Infection of the Human Host. *Microbiol Spectr* 4, 4.3.01.
- Gorrie, C.L. et al. 2017. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. *Clin Infect Dis* 65, 208–215.
- Grall, N., Andremont, A., and Armand-Lefèvre, L. 2011. Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? *Journal des Anti-infectieux* 13, 87–102.
- Green, E.R., and Mecsas, J. 2016. Bacterial Secretion Systems: An Overview, pp. 215–239. In Kudva, I.T., Cornick, N.A., Plummer, P.J., Zhang, Q., Nicholson, T.L., Bannantine, J.P., and Bellaire, B.H., eds, *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, Fifth Edition. American Society of Microbiology.
- Grohmann, E., Christie, P.J., Waksman, G., and Backert, S. 2018. Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 107, 455–471.
- Groisman, E.A. 2001. The Pleiotropic Two-Component Regulatory System PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* 183, 1835–1842.
- Gu, D. et al. 2018. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases* 18, 37–46.

Références bibliographiques

- 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., 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.
- Gutierrez, D. et al. 2020. Antibiotic-induced gut metabolome and microbiome alterations increase the susceptibility to *Candida albicans* colonization in the gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Ecol* 96, fiz187.
- Guzmán, K., Badia, J., Giménez, R., Aguilar, J., and Baldoma, L. 2011. Transcriptional Regulation of the Gene Cluster Encoding Allantoinase and Guanine Deaminase in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* 193, 2197–2207.
- Haapalainen, M. et al. 2012. Hcp2, a secreted protein of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, is required for fitness for competition against bacteria and yeasts. *J Bacteriol* 194, 4810–4822.
- Han, Y., Wang, T., Chen, G., Pu, Q., Liu, Q., Zhang, Y., Xu, L., Wu, M., and Liang, H. 2019. A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system regulated by CueR facilitates copper acquisition. *PLoS Pathog* 15, e1008198.
- Harding, C.M., Kinsella, R.L., Palmer, L.D., Skaar, E.P., and Feldman, M.F. 2016. Medically Relevant *Acinetobacter* Species Require a Type II Secretion System and Specific Membrane-Associated Chaperones for the Export of Multiple Substrates and Full Virulence. *PLoS Pathog* 12, e1005391.
- Hecht, A.L., Casterline, B.W., Earley, Z.M., Goo, Y.A., Goodlett, D.R., and Bubeck Wardenburg, J. 2016. Strain competition restricts colonization of an enteric pathogen and prevents colitis. *EMBO Rep* 17, 1281–1291.
- Hernandez, R.E., Gallegos-Monterrosa, R., and Coulthurst, S.J. 2020. Type VI secretion system effector proteins: Effective weapons for bacterial competitiveness. *Cell Microbiol* 22, e13241.
- Hersch, S.J., Manera, K., and Dong, T.G. 2020. Defending against the Type Six Secretion System: beyond Immunity Genes. *Cell Reports* 33, 108259.
- Ho, B.T., Dong, T.G., and Mekalanos, J.J. 2014. A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell Host Microbe* 15, 9–21.
- Holt, K.E. et al. 2015. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E3574–E3581.
- Hood, R.D. et al. 2010. A Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Targets a Toxin to Bacteria. *Cell Host Microbe* 7, 25–37.
- 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., 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, F., Schwarz, S., and Mougous, J.D. 2009. TagR promotes PpkA-catalysed type VI secretion activation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 72, 1111–1125.

Références bibliographiques

- Hu, H., Zhang, H., Gao, Z., Wang, D., Liu, G., Xu, J., Lan, K., and Dong, Y. 2014. Structure of the type VI secretion phospholipase effector Tle1 provides insight into its hydrolysis and membrane targeting. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 70, 2175–2185.
- Hu, Y., He, L.-H., Xiao, D., Liu, G.-D., Gu, Y.-X., Tao, X.-X., and Zhang, J.-Z. 2012. Bacterial flora concurrent with *Helicobacter pylori* in the stomach of patients with upper gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol* 18, 1257–1261.
- Hugon, P., Dufour, J.-C., Colson, P., Fournier, P.-E., Sallah, K., and Raoult, D. 2015. A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. *The Lancet Infectious Diseases* 15, 1211–1219.
- Ibarra, J.A., and Steele-Mortimer, O. 2009. *Salmonella* – the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cellular Microbiology* 11, 1579–1586.
- Jakobsson, H.E., Jernberg, C., Andersson, A.F., Sjölund-Karlsson, M., Jansson, J.K., and Engstrand, L. 2010. Short-Term Antibiotic Treatment Has Differing Long-Term Impacts on the Human Throat and Gut Microbiome. *PLoS One* 5, e9836.
- Jana, B., Fridman, C.M., Bosis, E., and Salomon, D. 2019. A modular effector with a DNase domain and a marker for T6SS substrates. *Nat Commun* 10, 3595.
- Jawhara, S., Thuru, X., Standaert-Vitse, A., Jouault, T., Mordon, S., Sendid, B., Desreumaux, P., and Poulain, D. 2008. Colonization of Mice by *Candida albicans* Is Promoted by Chemically Induced Colitis and Augments Inflammatory Responses through Galectin-3. *J Infect Dis* 197, 972–980.
- Jeffery, I.B., Claesson, M.J., O'Toole, P.W., and Shanahan, F. 2012. Categorization of the gut microbiota: enterotypes or gradients? *Nat Rev Microbiol* 10, 591–592.
- Jelsbak, L., Thomsen, L.E., Wallrodt, I., Jensen, P.R., and Olsen, J.E. 2012. Polyamines Are Required for Virulence in *Salmonellav enterica* Serovar Typhimurium. *PLoS ONE* 7, e36149.
- Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C., and Jansson, J.K. 2007. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J* 1, 56–66.
- Jiang, F., Waterfield, N.R., Yang, J., Yang, G., and Jin, Q. 2014. A *Pseudomonas aeruginosa* Type VI Secretion Phospholipase D Effector Targets Both Prokaryotic and Eukaryotic Cells. *Cell Host & Microbe* 15, 600–610.
- Johnson, S., and Gerding, D.N. 1998. *Clostridium difficile*–Associated Diarrhea. *Clinical Infectious Diseases* 8.
- Johnson, T.L., Waack, U., Smith, S., Mobley, H., and Sandkvist, M. 2016. *Acinetobacter baumannii* Is Dependent on the Type II Secretion System and Its Substrate LipA for Lipid Utilization and *In Vivo* Fitness. *J Bacteriol* 198, 711–719.
- Jones, C., Allsopp, L., Horlick, J., Kulasekara, H., and Filloux, A. 2013. Subinhibitory Concentration of Kanamycin Induces the *Pseudomonas aeruginosa* type VI Secretion System. *PLoS One* 8, e81132.
- 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.
- Journet, L., and Cascales, E. 2016. The Type VI Secretion System in *Escherichia coli* and Related Species. *EcoSal Plus* 7.
- Juge, N. 2012. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends in Microbiology* 20, 30–39.

Références bibliographiques

- Juhász, J. et al. 2021. Colonization Dynamics of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Are Dictated by Microbiota-Cluster Group Behavior over Individual Antibiotic Susceptibility: A Metataxonomic Analysis. *Antibiotics* 10, 268.
- Jurénas, D., and Cascales, E. 2022. T6SS: killing two bugs with one stone. *Trends in Microbiology* 30, 1–2.
- Jurénas, D., and Journet, L. 2021. Activity, delivery, and diversity of Type VI secretion effectors. *Mol Microbiol* 115, 383–394.
- Jurénas, D., Rosa, L.T., Rey, M., Chamot-Rooke, J., Fronzes, R., and Cascales, E. 2021. Mounting, structure and autocleavage of a type VI secretion-associated Rhs polymorphic toxin. *Nat Commun* 12, 6998.
- Kamada, N., Chen, G.Y., Inohara, N., and Núñez, G. 2013. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol* 14, 685–690.
- Kaniga, K., Delor, I., and Cornelis, G.R. 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 109, 137–141.
- Kapitein, N., Bönemann, G., Pietrosiuk, A., Seyffer, F., Hausser, I., Locker, J.K., and Mogk, A. 2013. ClpV recycles VipA/VipB tubules and prevents non-productive tubule formation to ensure efficient type VI protein secretion. *Mol Microbiol* 87, 1013–1028.
- Khater, F., Balestrino, D., Charbonnel, N., Dufayard, J.F., Brisson, 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.
- Khodadadian, R., Rahdar, H.A., Javadi, A., Safari, M., and Khorshidi, A. 2018. Detection of VIM-1 and IMP-1 genes in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation. *Microbial Pathogenesis* 115, 25–30.
- Kidess, E., Kleerebezem, M., and Brugman, S. 2021. Colonizing Microbes, IL-10 and IL-22: Keeping the Peace at the Mucosal Surface. *Front Microbiol* 12.
- Kierbel, A., Gassama-Diagne, A., Mostov, K., and Engel, J.N. 2005. The Phosphoinositol-3-Kinase–Protein Kinase B/Akt Pathway Is Critical for *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAK Internalization. *Mol Biol Cell* 16, 2577–2585.
- Kirchberger, P.C., Unterweger, D., Provenzano, D., Pukatzki, S., and Boucher, Y. 2017. Sequential displacement of Type VI Secretion System effector genes leads to evolution of diverse immunity gene arrays in *Vibrio cholerae*. *Sci Rep* 7, 45133.
- Knight, J. 2019. Gastrointestinal tract 6: the effects of gut microbiota on human health. *Nursing Times*.
- Ko, W.-C. 2002. Community-Acquired *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Global Differences in Clinical Patterns. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 160–166.
- Kontopoulou, K., Iosifidis, E., Antoniadou, E., Tasioudis, P., Petinaki, E., Malli, E., Metallidis, S., Vatopoulos, A., and Malisiovas, N. 2019. The clinical significance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* rectal colonization in critically ill patients: from colonization to bloodstream infection. *J Med Microbiol* 68, 326–335.
- Kooi, C., and Sokol, P.A.Y. 2009. 2009. *Burkholderia cenocepacia* zinc metalloproteases influence resistance to antimicrobial peptides. *Microbiology* 155, 2818–2825.
- Korotkov, K.V., Sandkvist, M., and Hol, W.G.J. 2012. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol* 10, 336–351.

Références bibliographiques

- Koskineni, S., Lamoureux, J.G., Nikolakakis, K.C., t'Kint de Roodenbeke, C., Kaplan, M.D., Low, D.A., and Hayes, C.S. 2013. Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7032–7037.
- Kube, S., Kapitein, N., Zimniak, T., Herzog, F., Mogk, A., and Wendler, P. 2014. Structure of the VipA/B Type VI Secretion Complex Suggests a Contraction-State-Specific Recycling Mechanism. *Cell Reports* 8, 20–30.
- Kulkarni, R., Dhakal, B.K., Slechta, E.S., Kurtz, Z., Mulvey, M.A., and Thanassi, D.G. 2009. Roles of Putative Type II Secretion and Type IV Pilus Systems in the Virulence of Uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One* 4, e4752.
- LaCourse, K.D., Peterson, S.B., Kulasekara, H.D., Radey, M.C., Kim, J., and Mougous, J.D. 2018. Conditional toxicity and synergy drive diversity among antibacterial effectors. *Nat Microbiol* 3, 440–446.
- Lan, Y., Zhou, M., Jian, Z., Yan, Q., Wang, S., and Liu, W. 2019. Prevalence of pks gene cluster and characteristics of *Klebsiella pneumoniae* -induced bloodstream infections. *J Clin Lab Anal* 33, e22838.
- Lange, K., Buerger, M., Stallmach, A., and Bruns, T. 2016. Effects of Antibiotics on Gut Microbiota. *Dig Dis* 34, 260–268.
- 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.
- Le, N.-H., Pinedo, V., Lopez, J., Cava, F., and Feldman, M.F. 2021. Killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by a bifunctional cell wall-targeting T6SS effector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 118, e2106555118.
- Leatham, M.P., Banerjee, S., Autieri, S.M., Mercado-Lubo, R., Conway, T., and Cohen, P.S. 2009. Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine. *Infect Immun* 77, 2876–2886.
- Lebeaux, D., and Ghigo, J.-M. 2012. Infections associées aux biofilms. *m/s* 28, 13.
- Ledvina, H.E. et al. 2018. A Phosphatidylinositol 3-Kinase Effector Alters Phagosomal Maturation to Promote Intracellular Growth of *Francisella*. *Cell Host & Microbe* 24, 285–295.e8.
- 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.
- Lee, M., and Choi, T.-J. 2021. Antimicrobial Resistance Caused by KPC-2 Encoded by Promiscuous Plasmids of the *Klebsiella pneumoniae* ST307 Strain. *Ann Lab Med* 41, 86–94.
- Leiman, P.G., Basler, M., Ramagopal, U.A., Bonanno, J.B., Sauder, J.M., Pukatzki, S., Burley, S.K., Almo, S.C., and Mekalanos, J.J. 2009. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 4154–4159.
- Lery, L.M. et al. 2014. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* genomes identifies a phospholipase D family protein as a novel virulence factor. *BMC Biol* 12.
- Levast, B., Li, Z., and Madrenas, J. 2015. The role of IL-10 in microbiome-associated immune modulation and disease tolerance. *Cytokine* 75, 291–301.
- Li, H. et al. 2015. The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. *Nat Commun* 6, 8292.

- 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, W., Liu, X., Tsui, W., Xu, A., Li, D., Zhang, X., Li, P., Bian, X., and Zhang, J. 2022. Identification and Comparative Genomic Analysis of Type VI Secretion Systems and Effectors in *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol.* 13, 853744.
- Liang, X., Moore, R., Wilton, M., Wong, M.J.Q., Lam, L., and Dong, T.G. 2015. Identification of divergent type VI secretion effectors using a conserved chaperone domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 9106–9111.
- Liao, W., Huang, H., Huang, Q., Fang-Ling, D., Dan Wei, D., La-Gen, W., Xiang, T., Zhang, W., and Liu, Y. 2022. Distribution of type VI secretion system (T6SS) in clinical *Klebsiella pneumoniae* strains from a Chinese hospital and its potential relationship with virulence and drug resistance. *Microbial Pathogenesis* 162, 105085.
- Lien, Y.-W., and Lai, E.-M. 2017. Type VI Secretion Effectors: Methodologies and Biology. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 254.
- Lin, J., Cheng, J., Chen, K., Guo, C., Zhang, W., Yang, X., Ding, W., Ma, L., Wang, Y., and Shen, X. 2015. The icmF3 locus is involved in multiple adaptation- and virulence-related characteristics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Front Cell Infect Microbiol* 5.
- Lin, J., Zhang, W., Cheng, J., Yang, X., Zhu, K., Wang, Y., Wei, G., Qian, P.-Y., Luo, Z.-Q., and Shen, X. 2017. A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. *Nat Commun* 8, 14888.
- Lin, J.-S., Ma, L.-S., and Lai, E.-M. 2013. Systematic Dissection of the Agrobacterium Type VI Secretion System Reveals Machinery and Secreted Components for Subcomplex Formation. *PLoS One* 8, e67647.
- Lin, L., Capozzoli, R., Ferrand, A., Plum, M., Vettiger, A., and Basler, M. 2022. Subcellular localization of Type VI secretion system assembly in response to cell–cell contact. *EMBO J* 41, e108595.
- Lin, L., and Zhang, J. 2017. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunol* 18, 2.
- 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.
- Liu, J., Guo, J.-T., Li, Y.-G., Johnston, R.N., Liu, G.-R., and Liu, S.-L. 2013. The type VI secretion system gene cluster of *Salmonella Typhimurium*: required for full virulence in mice. *J Basic Microbiol* 53, 600–607.
- Liu, L., Ye, M., Li, X., Li, J., Deng, Z., Yao, Y.-F., and Ou, H.-Y. 2017. Identification and Characterization of an Antibacterial Type VI Secretion System in the Carbapenem-Resistant Strain *Klebsiella pneumoniae* HS11286. *Front Cell Infect Microbiol* 7.
- Liu, Y.-C., Cheng, D.-L., and Lin, C.-L. 1986. *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess Associated With Septic Endophthalmitis. *Archives of Internal Medicine* 146, 1913–1916.
- Loeven, N.A., Perault, A.I., Cotter, P.A., Hodges, C.A., Schwartzman, J.D., Hampton, T.H., and Bliska, J.B. 2021. The *Burkholderia cenocepacia* Type VI Secretion System Effector TecA Is a Virulence Factor in Mouse Models of Lung Infection. *mBio* 12, e0209821.
- Logger, L., Aschtgen, M.-S., Guérin, M., Cascales, E., and Durand, E. 2016. Molecular Dissection of the Interface between the Type VI Secretion TssM Cytoplasmic Domain and the TssG Baseplate Component. *Journal of Molecular Biology* 428, 4424–4437.

Références bibliographiques

- Long, S.W., Olsen, R.J., Eagar, T.N., Beres, S.B., Zhao, P., Davis, J.J., Brettin, T., Xia, F., and Musser, J.M. 2017. Population Genomic Analysis of 1,777 Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates, Houston, Texas: Unexpected Abundance of Clonal Group 307. *mBio* 8, e00489-17.
- Looft, T. et al. 2012. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 1691–1696.
- Looft, T., and Allen, H.K. 2012. Collateral effects of antibiotics on mammalian gut microbiomes. *Gut Microbes* 3, 463–467.
- Looft, T., Allen, H.K., Cantarel, B.L., Levine, U.Y., Bayles, D.O., Alt, D.P., Henrissat, B., and Stanton, T.B. 2014. Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. *ISME J* 8, 1566–1576.
- Lopez, J., Ly, P.M., and Feldman, M.F. 2020. The Tip of the VgrG Spike Is Essential to Functional Type VI Secretion System Assembly in *Acinetobacter baumannii*. *mBio* 11, e02761-19.
- Lossi, N.S., Manoli, E., Förster, A., Dajani, R., Pape, T., Freemont, P., and Filloux, A. 2013. The HsiB1C1 (TssB-TssC) Complex of the *Pseudomonas aeruginosa* Type VI Secretion System Forms a Bacteriophage Tail Sheathlike Structure. *J Biol Chem* 288, 7536–7548.
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., and Knight, R. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489, 220–230.
- Lu, H.-F., Wu, B.-K., Huang, Y.-W., Lee, M.-Z., Li, M.-F., Ho, H.-J., Yang, H.-C., and Yang, T.-C. 2020. PhoPQ two-component regulatory system plays a global regulatory role in antibiotic susceptibility, physiology, stress adaptation, and virulence in *Stenotrophomonas maltophilia*. *BMC Microbiol* 20, 312.
- Lu, M.-C., Chen, Y.-T., Chiang, M.-K., Wang, Y.-C., Hsiao, P.-Y., Huang, Y.-J., Lin, C.-T., Cheng, C.-C., Liang, C.-L., and Lai, Y.-C. 2017. Colibactin Contributes to the Hypervirulence of pks+ K1 CC23 *Klebsiella pneumoniae* in Mouse Meningitis Infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7.
- Lucas, C. 2018. Rôle de l'autophagie dans la réponse de l'hôte suite à l'infection par des *Escherichia coli* producteurs de colibactine isolés de patients atteints d'un cancer colorectal.
- Luirink, J., and Sinning, I. 2004. SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1694, 17–35.
- Ma, A.T., McAuley, S., Pukatzki, S., and Mekalanos, J.J. 2009. Translocation of a *Vibrio cholerae* Type VI Secretion Effector Requires Bacterial Endocytosis by Host Cells. *Cell Host & Microbe* 5, 234–243.
- Ma, A.T., and Mekalanos, J.J. 2010. In vivo actin cross-linking induced by *Vibrio cholerae* type VI secretion system is associated with intestinal inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 4365–4370.
- Ma, J., Pan, Z., Huang, J., Sun, M., Lu, C., and Yao, H. 2017a. The Hcp proteins fused with diverse extended-toxin domains represent a novel pattern of antibacterial effectors in type VI secretion systems. *Virulence* 8, 1189–1202.
- Ma, J., Sun, M., Dong, W., Pan, Z., Lu, C., and Yao, H. 2017b. PAAR-Rhs proteins harbor various C-terminal toxins to diversify the antibacterial pathways of type VI secretion systems. *Environ Microbiol* 19, 345–360.
- Ma, J., Sun, M., Pan, Z., Lu, C., and Yao, H. 2018. Diverse toxic effectors are harbored by vgrG islands for interbacterial antagonism in type VI secretion system. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1862, 1635–1643.

Références bibliographiques

- Magnúsdóttir, S., Ravcheev, D., Crécy-Lagard, V. de, and Thiele, I. 2015. Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes. *Front. Genet.* 6.
- Magrone, T., and Jirillo, E. 2013. The interplay between the gut immune system and microbiota in health and disease: nutraceutical intervention for restoring intestinal homeostasis. *Curr Pharm Des* 19, 1329–1342.
- Maharshak, N., Packey, C.D., Ellermann, M., Manick, S., Siddle, J.P., Huh, E.Y., Plevy, S., Sartor, R.B., and Carroll, I.M. 2013. Altered enteric microbiota ecology in interleukin 10-deficient mice during development and progression of intestinal inflammation. *Gut Microbes* 4, 316–324.
- Manera, K., Kamal, F., Burkinshaw, B., and Dong, T.G. 2022. Essential functions of chaperones and adaptors of protein secretion systems in Gram-negative bacteria. *FEBS Lett.* 289, 4704–4717.
- Mangin, I., Lévêque, C., Magne, F., Suau, A., and Pochart, P. 2012. Long-Term Changes in Human Colonic *Bifidobacterium* Populations Induced by a 5-Day Oral Amoxicillin-Clavulanic Acid Treatment. *PLoS One* 7, e50257.
- Mariano, G., Trunk, K., Williams, D.J., Monlezun, L., Strahl, H., Pitt, S.J., and Coulthurst, S.J. 2019. A family of Type VI secretion system effector proteins that form ion-selective pores. *Nat Commun* 10, 5484.
- Maroncle, N., Rich, C., and Forestier, C. 2006. The role of *Klebsiella pneumoniae* urease in intestinal colonization and resistance to gastrointestinal stress. *Res Microbiol* 157, 184–193.
- Marteau, P. 2013. Microbiote intestinal. *EMC - Gastro-entérologie* 8, 1–8.
- Martens, E.C., Roth, R., Heuser, J.E., and Gordon, J.I. 2009. Coordinate regulation of glycan degradation and polysaccharide capsule biosynthesis by a prominent human gut symbiont. *J Biol Chem* 284, 18445–18457.
- Martin, R.M., and Bachman, M.A. 2018. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol* 8.
- 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, mSphere.00261-16, e00261-16.
- Martin, R.M., Cao, J., Wu, W., Zhao, L., Manthei, D.M., Pirani, A., Snitkin, E., Malani, P.N., Rao, K., and Bachman, M.A. 2018. Identification of Pathogenicity-Associated Loci in *Klebsiella pneumoniae* from Hospitalized Patients. *mSystems* 3, e00015-18.
- Martinez, J.E., Kahana, D.D., Ghuman, S., Wilson, H.P., Wilson, J., Kim, S.C.J., Lagishetty, V., Jacobs, J.P., Sinha-Hikim, A.P., and Friedman, T.C. 2021. Unhealthy Lifestyle and Gut Dysbiosis: A Better Understanding of the Effects of Poor Diet and Nicotine on the Intestinal Microbiome. *Front. Endocrinol.* 12.
- Martin-Gallausiaux, C., Marinelli, L., Blottièvre, H.M., Larraufie, P., and Lapaque, N. 2021. SCFA: mechanisms and functional importance in the gut. *Proc Nutr Soc* 80, 37–49.
- McGuckin, M.A., Lindén, S.K., Sutton, P., and Florin, T.H. 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol* 9, 265–278.
- Meatherall, B.L., Gregson, D., Ross, T., Pitout, J.D.D., and Laupland, K.B. 2009. Incidence, Risk Factors, and Outcomes of *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. *Am. J. Med.* 122, 866–873.
- Medrano, E.G., and Bell, A.A. 2017. Demonstration that a *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* isolated from an insect (*Nezara viridula*) harbors a plasmid-borne type IV secretion system. *Curr Microbiol* 74, 1033–1042.

- 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.
- Miquel, S., Martín, R., Rossi, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Chatel, J.M., Sokol, H., Thomas, M., Wells, J.M., and Langella, P. 2013. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol* 16, 255–261.
- Miyata, S.T., Kitaoka, M., Brooks, T.M., McAuley, S.B., and Pukatzki, S. 2011. *Vibrio cholerae* Requires the Type VI Secretion System Virulence Factor VasX To Kill *Dictyostelium discoideum*. *Infect Immun* 79, 2941–2949.
- Miyata, S.T., Unterweger, D., Rudko, S.P., and Pukatzki, S. 2013. Dual Expression Profile of Type VI Secretion System Immunity Genes Protects Pandemic *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog* 9, e1003752.
- Mobley, H.L., Green, D.M., Trifillis, A.L., Johnson, D.E., Chippendale, G.R., Lockatell, C.V., Jones, B.D., and Warren, J.W. 1990. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect Immun* 58, 1281–1289.
- Mok, B.Y. et al. 2020. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. *Nature* 583, 631–637.
- Momose, Y., Hirayama, K., and Itoh, K. 2008. Effect of organic acids on inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 colonization in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota. *Antonie Van Leeuwenhoek* 93, 141–149.
- Mougous, J.D. et al. 2006. A Virulence Locus of *Pseudomonas aeruginosa* Encodes a Protein Secretion Apparatus. *Science* 312, 1526–1530.
- Mu, S. et al. 2022. The pathogens of secondary infection in septic patients share a similar genotype to those that predominate in the gut. *Crit Care* 26, 68.
- Müller, M. 2005. Twin-arginine-specific protein export in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* 156, 131–136.
- 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.
- Nagai, H., and Kubori, T. 2011. Type IVB Secretion Systems of *Legionella* and Other Gram-Negative Bacteria. *Front. Microbiol*. 2.
- do Nascimento Soares, T., Silva Valadares, V., Cardoso Amorim, G., de Mattos Lacerda de Carvalho, M., Berrêdo-Pinho, M., Ceneviva Lacerda Almeida, F., Mascarello Bisch, P., Batista, P.R., and Miranda Santos Lery, L. 2022. The C-terminal extension of VgrG4 from *Klebsiella pneumoniae* remodels host cell microfilaments. *Proteins* prot.26344.
- Navarro-Garcia, F., Ruiz-Perez, F., Cataldi, Á., and Larzábal, M. 2019. Type VI Secretion System in Pathogenic *Escherichia coli*: Structure, Role in Virulence, and Acquisition. *Front Microbiol* 10, 1965.
- Nguyen, V.S. et al. 2017. Type VI secretion TssK baseplate protein exhibits structural similarity with phage receptor-binding proteins and evolved to bind the membrane complex. *Nat Microbiol* 2, 17103.
- Nguyen, V.S., Spinelli, S., Cascales, É., Roussel, A., Cambillau, C., and Leone, P. 2021. Anchoring the T6SS to the cell wall: Crystal structure of the peptidoglycan binding domain of the TagL accessory protein. *PLoS One* 16, e0254232.

Références bibliographiques

- Olsan, E.E., Byndloss, M.X., Faber, F., Rivera-Chávez, F., Tsolis, R.M., and Bäumler, A.J. 2017. Colonization resistance: The deconvolution of a complex trait. *Journal of Biological Chemistry* 292, 8577–8581.
- Osbelt, L. et al. 2021. *Klebsiella oxytoca* causes colonization resistance against multidrug-resistant *K. pneumoniae* in the gut via cooperative carbohydrate competition. *Cell Host Microbe* 29, 1663-1679.e7.
- de Pace, F., Boldrin de Paiva, J., Nakazato, G., Lancellotti, M., Sircili, M.P., Guedes Stehling, E., Dias da Silveira, W., and Sperandio, V. 2011. Characterization of IcmF of the type VI secretion system in an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain. *Microbiology* 157, 2954–2962.
- Paczosa, M.K., and Mecsas, J. 2016. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev* 80, 629–661.
- Palmer, T., and Berks, B.C. 2012. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat Rev Microbiol* 10, 483–496.
- Pan, H., Lou, Y., Zeng, L., Wang, L., Zhang, J., Yu, W., and Qiu, Y. 2019. Infections Caused by Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Microbiological Characteristics and Risk Factors. *Microb Drug Resist* 25, 287–296.
- Panpatch, W., Phuengmaung, P., Hiengrach, P., Issara-Amphorn, J., Cheibchalard, T., Somboonna, N., Tumwasorn, S., and Leelahanichkul, A. 2022. Candida Worsens *Klebsiella pneumoniae* Induced-Sepsis in a Mouse Model with Low Dose Dextran Sulfate Solution through Gut Dysbiosis and Enhanced Inflammation. *IJMS* 23, 7050.
- Papadimitriou-Olivgeris, M. et al. 2014. Association of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* colonization or infection with Candida isolation and selection of non-albicans species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 80, 227–232.
- Papanikou, E., Karamanou, S., and Economou, A. 2007. Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat Rev Microbiol* 5, 839–851.
- Paranjpye, R.N., and Strom, M.S. 2005. A *Vibrio vulnificus* Type IV Pilin Contributes to Biofilm Formation, Adherence to Epithelial Cells, and Virulence. *Infect Immun* 73, 1411–1422.
- Park, Y.-J., Lacourse, K.D., Cambillau, C., DiMaio, F., Mougous, J.D., and Veesler, D. 2018. Structure of the type VI secretion system TssK–TssF–TssG baseplate subcomplex revealed by cryo-electron microscopy. *Nat Commun* 9, 5385.
- Parsons, D.A., and Heffron, F. 2005. sciS, an icmF homolog in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, limits intracellular replication and decreases virulence. *Infect Immun* 73, 4338–4345.
- Passet, V., and Brisse, S. 2015. Association of Tellurite Resistance with Hypervirulent Clonal Groups of *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 53, 1380–1382.
- Patel, R., Smith, S.M., and Robinson, C. 2014. Protein transport by the bacterial Tat pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843, 1620–1628.
- Payros, D. et al. 2014. Maternally acquired genotoxic *Escherichia coli* alters offspring's intestinal homeostasis. *Gut Microbes* 5, 313–512.
- Pazoki, M., Darvish Alipour Astaneh, S., Ramezanalizadeh, F., Jahangiri, A., and Rasooli, I. 2021. Immunoprotectivity of Valine-glycine repeat protein G, a potent mediator of pathogenicity, against *Acinetobacter baumannii*. *Mol Immunol* 135, 276–284.
- Pena, R.T. et al. 2019. Relationship Between Quorum Sensing and Secretion Systems. *Front Microbiol* 10, 1100.

- Pérez-Nadale, E. et al. 2022. Prognostic Significance of the Relative Load of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* within the Intestinal Microbiota in a Prospective Cohort of Colonized Patients. *Microbiol Spectr* e0272821.
- Pissaridou, P., Allsopp, L.P., Wettstadt, S., Howard, S.A., Mavridou, D.A.I., and Filloux, A. 2018. The *Pseudomonas aeruginosa* T6SS-VgrG1b spike is topped by a PAAR protein eliciting DNA damage to bacterial competitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 12519–12524.
- Planamente, S., Salih, O., Manoli, E., Albesa-Jové, D., Freemont, P.S., and Filloux, A. 2016. TssA forms a gp6-like ring attached to the type VI secretion sheath. *EMBO J* 35, 1613–1627.
- Podschun, R., and Ullmann, U. 1998. *Klebsiella spp.* as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin Microbiol Rev* 11, 589–603.
- 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.
- Prorok-Hamon, M. et al. 2014. Colonic mucosa-associated diffusely adherent *afaC+* *Escherichia coli* expressing *lpfA* and *pks* are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Gut* 63, 761–770.
- Pugsley, A.P., d'Enfert, C., Reyss, I., and Kornacker, M.G. 1990. GENETICS OF EXTRACELLULAR PROTEIN SECRETION BY GRAM-NEGATIVE BACTERIA. *Annu. Rev. Genet.* 24, 67–90.
- Pugsley, A.P., Francetic, O., Hardie, K., Possot, O.M., Sauvonnet, N., and Seydel, A. 1997. Pullulanase: Model protein substrate for the general secretory pathway of gram-negative bacteria. *Folia Microbiol* 42, 184–192.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Revel, A.T., Sturtevant, D., and Mekalanos, J.J. 2007. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 15508–15513.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F., and Mekalanos, J.J. 2006. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 1528–1533.
- Putala, H., Salusjärvi, T., Nordström, M., Saarinen, M., Ouwehand, A.C., Bech Hansen, E., and Rautonen, N. 2008. Effect of four probiotic strains and *Escherichia coli* O157:H7 on tight junction integrity and cyclo-oxygenase expression. *Res Microbiol* 159, 692–698.
- Putze, J. et al. 2009. Genetic Structure and Distribution of the Colibactin Genomic Island among Members of the Family *Enterobacteriaceae*. *Infect Immun* 77, 4696–4703.
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., and Sintim, H.O. 2015. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med. Chem.* 7, 493–512.
- RAISIN. 2017. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, mai-juin 2017. 270.
- Ranjan, R., Rani, A., Metwally, A., McGee, H.S., and Perkins, D.L. 2016. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochem Biophys Res Commun* 469, 967–977.
- Rapisarda, C., Cherrak, Y., Kooger, R., Schmidt, V., Pellarin, R., Logger, L., Cascales, E., Pilhofer, M., Durand, E., and Fronzes, R. 2019. In situ and high-resolution cryo-EM structure of a bacterial type VI secretion system membrane complex. *EMBO J* 38, e100886.

Références bibliographiques

- Rashid, T., Ebringer, A., and Wilson, C. 2013. The Role of *Klebsiella* in Crohn's Disease with a Potential for the Use of Antimicrobial Measures. *International Journal of Rheumatology* 2013, 1–8.
- Rasmussen, T.B., and Givskov, M. 2006. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology* 296, 149–161.
- Renzi, F., Rescalli, E., Galli, E., and Bertoni, G. 2010. Identification of genes regulated by the MvaT-like paralogues TurA and TurB of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 12, 254–263.
- Reveles, K.R., Ryan, C.N., Chan, L., Cosimi, R.A., and Haynes, W.L. 2018. Proton pump inhibitor use associated with changes in gut microbiota composition. *Gut* 67, 1369–1370.
- Ringel, P.D., Hu, D., and Basler, M. 2017. The Role of Type VI Secretion System Effectors in Target Cell Lysis and Subsequent Horizontal Gene Transfer. *Cell Reports* 21, 3927–3940.
- Rodríguez, J.M. et al. 2015. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis* 26, 26050.
- Rôles du microbiote et pathologies. *Annabac*.
- Rosales-Reyes, R., Aubert, D.F., Tolman, J.S., Amer, A.O., and Valvano, M.A. 2012. *Burkholderia cenocepacia* Type VI Secretion System Mediates Escape of Type II Secreted Proteins into the Cytoplasm of Infected Macrophages. *PLoS One* 7, e41726.
- Ross, B.D., Verster, A.J., Radey, M.C., Schmidtke, D.T., Pope, C.E., Hoffman, L.R., Hajjar, A.M., Peterson, S.B., Borenstein, E., and Mougous, J.D. 2019. Human gut bacteria harbor acquired interbacterial defense systems. *Nature* 575, 224–228.
- Russell, A.B. et al. 2014. A Type VI Secretion-Related Pathway in Bacteroidetes Mediates Interbacterial Antagonism. *Cell Host Microbe* 16, 227–236.
- Russell, A.B. et al. 2012. A Widespread Bacterial Type VI Secretion Effector Superfamily Identified Using a Heuristic Approach. *Cell Host Microbe* 11, 538–549.
- Russell, A.B., Hood, R.D., Bui, N.K., LeRoux, M., Vollmer, W., and Mougous, J.D. 2011. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature* 475, 343–347.
- Russell, A.B., LeRoux, M., Hathazi, K., Agnello, D.M., Ishikawa, T., Wiggins, P.A., Wai, S.N., and Mougous, J.D. 2013. Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature* 496, 508–512.
- Russo, T.A. et al. 2018. Identification of Biomarkers for Differentiation of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from Classical *K. pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 56, e00776-18, /jcm/56/9/e00776-18.atom.
- Russo, T.A., and Marr, C.M. 2019. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Rev* 32, 42.
- Said, H.M. 2013. Recent advances in transport of water-soluble vitamins in organs of the digestive system: a focus on the colon and the pancreas. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 305, G601–G610.
- Salomon, D., Klimko, J.A., and Orth, K. 2014. H-NS regulates the *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1. *Microbiology* 160, 1867–1873.
- Sana, T.G. et al. 2015. Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 into Epithelial Cells Is Promoted by Interaction of a T6SS Effector with the Microtubule Network. *mBio* 6, e00712.
- Sana, T.G., Berni, B., and Bleves, S. 2016a. The T6SSs of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 and Their Effectors: Beyond Bacterial-Cell Targeting. *Front Cell Infect Microbiol* 6, 61.

Références bibliographiques

- 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. 2016b. *Salmonella* Typhimurium utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, E5044–E5051.
- Sana, T.G., Hachani, A., Bucior, I., Soscia, C., Garvis, S., Termine, E., Engel, J., Filloux, A., and Bleves, S. 2012. The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and Fur and modulates internalization in epithelial cells. *J Biol Chem* 287, 27095–27105.
- Sana, T.G., Lugo, K.A., and Monack, D.M. 2017. T6SS: The bacterial “fight club” in the host gut. *PLoS Pathog* 13, e1006325.
- Sandkvist, M., Michel, L.O., Hough, L.P., Morales, V.M., Bagdasarian, M., Koomey, M., DiRita, V.J., and Bagdasarian, M. 1997. General secretion pathway (eps) genes required for toxin secretion and outer membrane biogenesis in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 179, 6994–7003.
- Santin, Y.G., Camy, C.E., Zoued, A., Doan, T., Aschtgen, M.-S., and Cascales, E. 2019a. Role and Recruitment of the TagL Peptidoglycan-Binding Protein during Type VI Secretion System Biogenesis. *J Bacteriol* 201.
- Santin, Y.G., and Cascales, E. 2017. Domestication of a housekeeping transglycosylase for assembly of a Type VI secretion system. *EMBO Rep* 18, 138–149.
- Santin, Y.G., Doan, T., Journet, L., and Cascales, E. 2019b. Cell Width Dictates Type VI Secretion Tail Length. *Current Biology* 29, 3707–3713.e3.
- Santin, Y.G., Doan, T., Lebrun, R., Espinosa, L., Journet, L., and Cascales, E. 2018. *In vivo* TssA proximity labelling during type VI secretion biogenesis reveals TagA as a protein that stops and holds the sheath. *Nat Microbiol* 3, 1304–1313.
- Santos, A.L.S. dos, Galdino, A.C.M., Mello, T.P. de, Ramos, L. de S., Branquinha, M.H., Bolognese, A.M., Columbano Neto, J., and Roudbary, M. 2018. What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective! *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 113.
- Sarris, P.F., Zoumadakis, C., Panopoulos, N.J., and Scoulica, E.V. 2011. Distribution of the putative type VI secretion system core genes in *Klebsiella* spp. *Infect Genet Evol* 11, 157–166.
- Sauer, K. 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol* 5.
- Schamberger, G.P., and Diez-Gonzalez, F. 2002. Selection of recently isolated colicinogenic *Escherichia coli* strains inhibitory to *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot* 65, 1381–1387.
- Schneider, J.P., Nazarov, S., Adaixo, R., Liuzzo, M., Ringel, P.D., Stahlberg, H., and Basler, M. 2019. Diverse roles of TssA-like proteins in the assembly of bacterial type VI secretion systems. *EMBO J* 38, e100825.
- Schubert, A.M., Sinani, H., and Schloss, P.D. 2015. Antibiotic-Induced Alterations of the Murine Gut Microbiota and Subsequent Effects on Colonization Resistance against *Clostridium difficile*. *mBio* 6, e00974-15.
- Schwarz, S., Singh, P., Robertson, J.D., LeRoux, M., Skerrett, S.J., Goodlett, D.R., West, T.E., and Mougous, J.D. 2014. VgrG-5 Is a *Burkholderia* Type VI Secretion System-Exported Protein Required for Multinucleated Giant Cell Formation and Virulence. *Infect Immun* 82, 1445–1452.
- Schwarz, S., West, T.E., Boyer, F., Chiang, W.-C., Carl, M.A., Hood, R.D., Rohmer, L., Tolker-Nielsen, T., Skerrett, S.J., and Mougous, J.D. 2010. *Burkholderia* Type VI Secretion Systems Have Distinct Roles in Eukaryotic and Bacterial Cell Interactions. *PLoS Pathog* 6, e1001068.
- Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* 14, e1002533.

Références bibliographiques

- Serapio-Palacios, A. et al. 2022. Type VI secretion systems of pathogenic and commensal bacteria mediate niche occupancy in the gut. *Cell Rep* 39, 110731.
- Sgro, G.G. et al. 2019. Bacteria-Killing Type IV Secretion Systems. *Front. Microbiol.* 10, 1078.
- Shalom, G., Shaw, J.G., and Thomas, M.S. 2007. *In vivo* expression technology identifies a type VI secretion system locus in *Burkholderia pseudomallei* that is induced upon invasion of macrophages. *Microbiology* 153, 2689–2699.
- Sharma, R., Young, C., and Neu, J. 2010. Molecular Modulation of Intestinal Epithelial Barrier: Contribution of Microbiota. *J. biotechnol. biomed.* 2010, e305879.
- Sheahan, K.-L., Cordero, C.L., and Fullner Satchell, K.J. 2004. Identification of a domain within the multifunctional *Vibrio cholerae* RTX toxin that covalently cross-links actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 9798–9803.
- Shneider, M.M., Buth, S.A., Ho, B.T., Basler, M., Mekalanos, J.J., and Leiman, P.G. 2013. PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature* 500, 350–353.
- Shon, A.S., Bajwa, R.P.S., and Russo, T.A. 2013. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence* 4, 107–118.
- Si, M. et al. 2017a. The Type VI Secretion System Engages a Redox-Regulated Dual-Functional Heme Transporter for Zinc Acquisition. *Cell Rep* 20, 949–959.
- Si, M., Zhao, C., Burkinshaw, B., Zhang, B., Wei, D., Wang, Y., Dong, T.G., and Shen, X. 2017b. Manganese scavenging and oxidative stress response mediated by type VI secretion system in *Burkholderia thailandensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E2233–E2242.
- Sibinelli-Sousa, S., Hespanhol, J.T., Nicastro, G.G., Matsuyama, B.Y., Mesnage, S., Patel, A., de Souza, R.F., Guzzo, C.R., and Bayer-Santos, E. 2020. A Family of T6SS Antibacterial Effectors Related to I,d-Transpeptidases Targets the Peptidoglycan. *Cell Rep* 31, 107813.
- Silverman, J.M., Agnello, D.M., Zheng, H., Andrews, B.T., Li, M., Catalano, C.E., Gonen, T., and Mougous, J.D. 2013. Haemolysin Co-regulated Protein is an Exported Receptor and Chaperone of Type VI Secretion Substrates. *Mol Cell* 51.
- Silverman, J.M., Austin, L.S., Hsu, F., Hicks, K.G., Hood, R.D., and Mougous, J.D. 2011. Separate inputs modulate phosphorylation-dependent and -independent type VI secretion activation: Posttranslational regulation of type VI secretion. *Mol Microbiol* 82, 1277–1290.
- Sim, C.K. et al. 2022. A mouse model of occult intestinal colonization demonstrating antibiotic-induced outgrowth of carbapenem-resistant </i>Enterobacteriaceae</i>. *Microbiome* 10, 43.
- Simon, D.W. et al. 2020. Depletion of gut microbiota is associated with improved neurologic outcome following traumatic brain injury. *Brain Research* 1747, 147056.
- Sirot, D., Sirot, J., Labia, R., Morand, A., Courvalin, P., Darfeuille-Michaud, A., Perroux, R., and Cluzel, R. 1987. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β-lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 20, 323–334.
- Sirot, J., Chanal, C., Petit, A., Sirot, D., Labia, R., and Gerbaud, G. 1988. *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae* producing novel plasmid-mediated beta-lactamases markedly active against third-generation cephalosporins: epidemiologic studies. *Rev Infect Dis* 10, 850–859.
- Speare, L., Woo, M., Dunn, A.K., and Septer, A.N. 2022. A Putative Lipoprotein Mediates Cell-Cell Contact for Type VI Secretion System-Dependent Killing of Specific Competitors. *mBio* e03085-21.

Références bibliographiques

- Stacy, A. et al. 2021. Infection trains the host for microbiota-enhanced resistance to pathogens. *Cell* 184, 615–627.e17.
- Stewardson, A.J., Gaïa, N., François, P., Malhotra-Kumar, S., Delémont, C., Martinez de Tejada, B., Schrenzel, J., Harbarth, S., Lazarevic, V., and SATURN WP1 and WP3 Study Groups. 2015. Collateral damage from oral ciprofloxacin versus nitrofurantoin in outpatients with urinary tract infections: a culture-free analysis of gut microbiota. *Clin Microbiol Infect* 21, 344.e1–11.
- Storey, D. et al. 2020. *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system-mediated microbial competition is PhoPQ controlled and reactive oxygen species dependent. *PLoS Pathog* 16, e1007969.
- Strakova, N., Korena, K., and Karpiskova, R. 2021. *Klebsiella pneumoniae* producing bacterial toxin colibactin as a risk of colorectal cancer development - A systematic review. *Toxicon* 197, 126–135.
- Suarez, G., Sierra, J.C., Erova, T.E., Sha, J., Horneman, A.J., and Chopra, A.K. 2010. A Type VI Secretion System Effector Protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* That Induces Host Cell Toxicity by ADP Ribosylation of Actin. *J Bacteriol* 192, 155–168.
- Sysoeva, T.A., Zepeda-Rivera, M.A., Huppert, L.A., and Burton, B.M. 2014. Dimer recognition and secretion by the ESX secretion system in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 7653–7658.
- Takeuchi, T., and Ohno, H. 2021. Reciprocal regulation of IgA and the gut microbiota: a key mutualism in the intestine. *International Immunology* 33, 781–786.
- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A.N., Mackay, C.R., and Macia, L. 2014. The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv Immunol* 121, 91–119.
- Tang, J.Y., Bullen, N.P., Ahmad, S., and Whitney, J.C. 2018. Diverse NADase effector families mediate interbacterial antagonism via the type VI secretion system. *J Biol Chem* 293, 1504–1514.
- Tang, M.-X., Pei, T.-T., Xiang, Q., Wang, Z.-H., Luo, H., Wang, X.-Y., Fu, Y., and Dong, T. 2022. Abiotic factors modulate interspecies competition mediated by the type VI secretion system effectors in *Vibrio cholerae*. *ISME J* 16, 1765–1775.
- Tao, Z., Zhou, T., Zhou, S., and Wang, G. 2016. Temperature-regulated expression of type VI secretion systems in fish pathogen *Pseudomonas plecoglossicida* revealed by comparative secretome analysis. *FEMS Microbiol Lett* 363.
- Tauschek, M., Gorrell, R.J., Strugnell, R.A., and Robins-Browne, R.M. 2002. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 7066–7071.
- Taylor, N.M.I., Prokhorov, N.S., Guerrero-Ferreira, R.C., Shneider, M.M., Browning, C., Goldie, K.N., Stahlberg, H., and Leiman, P.G. 2016. Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction. *Nature* 533, 346–352.
- Teschler, J.K., Jiménez-Siebert, E., Jeckel, H., Singh, P.K., Park, J.H., Pukatzki, S., Nadell, C.D., Drescher, K., and Yildiz, F.H. 2022. VxrB Influences Antagonism within Biofilms by Controlling Competition through Extracellular Matrix Production and Type 6 Secretion. *mBio* e0188522.
- Tetz, G.V., Artemenko, N.K., and Tetz, V.V. 2009. Effect of DNase and Antibiotics on Biofilm Characteristics. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 1204–1209.
- Thomas, J., Watve, S.S., Ratcliff, W.C., and Hammer, B.K. 2017. Horizontal Gene Transfer of Functional Type VI Killing Genes by Natural Transformation. *mBio* 8, e00654-17.
- Thomas, V., Clark, J., and Doré, J. 2015. Fecal microbiota analysis: an overview of sample collection methods and sequencing strategies. *Future Microbiol* 10, 1485–1504.

Références bibliographiques

- Thursby, E., and Juge, N. 2017. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem* 474, 1823–1836.
- Ting, S.-Y. et al. 2018. Bifunctional Immunity Proteins Protect Bacteria against FtsZ-Targeting ADP-Ribosylating Toxins. *Cell* 175, 1380-1392.e14.
- Toesca, I.J., French, C.T., and Miller, J.F. 2014. The Type VI Secretion System Spike Protein VgrG5 Mediates Membrane Fusion during Intercellular Spread by Pseudomallei Group *Burkholderia* Species. *Infect Immun* 82, 1436–1444.
- Toledo-Arana, A. et al. 2009. The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* 459, 950–956.
- Tomás, A. et al. 2015. Functional Genomic Screen Identifies *Klebsiella pneumoniae* Factors Implicated in Blocking Nuclear Factor κB (NF-κB) Signaling. *J. Biol. Chem.* 290, 16678–16697.
- Tomljenovic-Berube, A.M., Mulder, D.T., Whiteside, M.D., Brinkman, F.S.L., and Coombes, B.K. 2010. Identification of the regulatory logic controlling *Salmonella* pathoadaptation by the SsrA-SsrB two-component system. *PLoS Genet* 6, e1000875.
- Tsirigotaki, A., De Geyter, J., Šoštaric’, N., Economou, A., and Karamanou, S. 2017. Protein export through the bacterial Sec pathway. *Nat Rev Microbiol* 15, 21–36.
- Ubeda, C. et al. 2010. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J. Clin. Invest.* 120, 4332–4341.
- Uchida, K., Leiman, P.G., Arisaka, F., and Kanamaru, S. 2014. Structure and properties of the C-terminal β-helical domain of VgrG protein from *Escherichia coli* O157. *J Biol Chem* 155, 173–182.
- Unterweger, D., Kostiuk, B., Ötjengerdes, R., Wilton, A., Diaz-Satizabal, L., and Pukatzki, S. 2015. Chimeric adaptor proteins translocate diverse type VI secretion system effectors in *Vibrio cholerae*. *EMBO J* 34, 2198–2210.
- Unterweger, D., Kostiuk, B., and Pukatzki, S. 2017. Adaptor Proteins of Type VI Secretion System Effectors. *Trends Microbiol* 25, 8–10.
- Vaishnav, S., Behrendt, C.L., Ismail, A.S., Eckmann, L., and Hooper, L.V. 2008. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20858–20863.
- Van Laere, K.M.J., Hartemink, R., Bosveld, M., Schols, H.A., and Voragen, A.G.J. 2000. Fermentation of Plant Cell Wall Derived Polysaccharides and Their Corresponding Oligosaccharides by Intestinal Bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1644–1652.
- 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.
- Vettiger, A., Winter, J., Lin, L., and Basler, M. 2017. The type VI secretion system sheath assembles at the end distal from the membrane anchor. *Nat Commun* 8, 16088.
- Vornhagen, J. et al. 2021. A plasmid locus associated with *Klebsiella* clinical infections encodes a microbiome-dependent gut fitness factor. *PLoS Pathog* 17, e1009537.
- Wang, J., Brackmann, M., Castaño-Díez, D., Kudryashev, M., Goldie, K.N., Maier, T., Stahlberg, H., and Basler, M. 2017. Cryo-EM structure of the extended type VI secretion system sheath–tube complex. *Nat Microbiol* 2, 1507–1512.

Références bibliographiques

- Wang, N. et al. 2022. Prevalence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection in a Northern Province in China: Clinical Characteristics, Drug Resistance, and Geographic Distribution. *Infect Drug Resist* Volume 15, 569–579.
- Wang, S. et al. 2019. The Ferric Uptake Regulator Represses Type VI Secretion System Function by Binding Directly to the *clpV* Promoter in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Infect Immun* 87, e00562-19.
- Wang, T. et al. 2015. Type VI Secretion System Transports Zn²⁺ to Combat Multiple Stresses and Host Immunity. *PLoS Pathog* 11, e1005020.
- Wang, X., Wang, Q., Xiao, J., Liu, Q., Wu, H., Xu, L., and Zhang, Y. 2009. *Edwardsiella tarda* T6SS component evpP is regulated by esrB and iron, and plays essential roles in the invasion of fish. *Fish Shellfish Immunol* 27, 469–477.
- Weber, B.S., Hennon, S.W., Wright, M.S., Scott, N.E., de Berardinis, V., Foster, L.J., Ayala, J.A., Adams, M.D., and Feldman, M.F. 2016. Genetic Dissection of the Type VI Secretion System in *Acinetobacter* and Identification of a Novel Peptidoglycan Hydrolase, TagX, Required for Its Biogenesis. *mBio* 7, e01253-16.
- Weber, B.S., Miyata, S.T., Iwashkiw, J.A., Mortensen, B.L., Skaar, E.P., Pukatzki, S., and Feldman, M.F. 2013. Genomic and Functional Analysis of the Type VI Secretion System in *Acinetobacter*. *PLoS One* 8, e55142.
- Wettstadt, S., Wood, T.E., Fecht, S., and Filloux, A. 2019. Delivery of the *Pseudomonas aeruginosa* Phospholipase Effectors PldA and PldB in a VgrG- and H2-T6SS-Dependent Manner. *Front Microbiol*. 10.
- Whitney, J.C. et al. 2015. An Interbacterial NAD(P)+ Glycohydrolase Toxin Requires Elongation Factor Tu for Delivery to Target Cells. *Cell* 163, 607–619.
- Whitney, J.C. et al. 2014. Genetically distinct pathways guide effector export through the type VI secretion system. *Mol Microbiol* 92, 529–542.
- Williams, S.G., Varcoe, L.T., Attridge, S.R., and Manning, P.A. 1996. *Vibrio cholerae* Hcp, a secreted protein coregulated with HlyA. *Infect Immun* 64, 283–289.
- Winardhi, R.S., Yan, J., and Kenney, L.J. 2015. H-NS Regulates Gene Expression and Compacts the Nucleoid: Insights from Single-Molecule Experiments. *Biophysical Journal* 109, 1321–1329.
- Wolff, N.S., Jacobs, M.C., Wiersinga, W.J., and Hugenholz, F. 2021. Pulmonary and intestinal microbiota dynamics during Gram-negative pneumonia-derived sepsis. *ICMx* 9, 35.
- Wong Fok Lung, T. et al. 2022. *Klebsiella pneumoniae* induces host metabolic stress that promotes tolerance to pulmonary infection. *Cell Metabolism* S1550413122000973.
- Wood, T.E. et al. 2019. The *Pseudomonas aeruginosa* T6SS Delivers a Periplasmic Toxin that Disrupts Bacterial Cell Morphology. *Cell Rep* 29, 187-201.e7.
- Wrzosek, L. et al. 2013. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biol* 11, 61.
- Wyres, K.L., and Holt, K.E. 2018. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr Opin Microbiol* 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.

Références bibliographiques

- Xenofontos, E., Renieris, G., Kalogridi, M., Droggiti, D.-E., Synodinou, K., Damoraki, G., Koufaryris, P., Sabracos, L., and Giamarellos-Bourboulis, E.J. 2022. An animal model of limitation of gut colonization by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* using rifaximin. *Sci Rep* 12, 3789.
- Xu, H. et al. 2014. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. *Nature* 513, 237–241.
- Xue, J. et al. 2016. Influence of cAMP receptor protein (CRP) on bacterial virulence and transcriptional regulation of *allS* by CRP in *Klebsiella pneumoniae*. *Gene* 593, 28–33.
- Yadav, M., Verma, M.K., and Chauhan, N.S. 2018. A review of metabolic potential of human gut microbiome in human nutrition. *Arch Microbiol* 200, 203–217.
- Yan, R. et al. 2021. Anticolonization of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* by *Lactobacillus plantarum* LP1812 Through Accumulated Acetic Acid in Mice Intestinal. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 804253.
- Yang, J., Yang, Y., Ishii, M., Nagata, M., Aw, W., Obana, N., Tomita, M., Nomura, N., and Fukuda, S. 2020. Does the Gut Microbiota Modulate Host Physiology through Polymicrobial Biofilms? *Microb. Environ.* 35, n/a.
- Yin, M., Yan, Z., and Li, X. 2019. Architecture of type VI secretion system membrane core complex. *Cell Res* 29, 251–253.
- Yu, W.-L., Ko, W.-C., Cheng, K.-C., Lee, C.-C., Lai, C.-C., and Chuang, Y.-C. 2008. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 62, 1–6.
- Zhang, X., Bishop, P.L., and Kupferle, M.J. 1998. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Science and Technology* 37, 345–348.
- Zhang, X.Y., Brunet, Y.R., Logger, L., Douzi, B., Cambillau, C., Journet, L., and Cascales, E. 2013. Dissection of the TssB-TssC interface during type VI secretion sheath complex formation. *PLoS One* 8, e81074.
- Zhang, Y., Xu, Y., and Huang, Y. 2022. Virulence Genotype and Correlation of Clinical Severeness with Presence of the Type VI Secretion System in *Klebsiella pneumoniae* Isolates Causing Bloodstream Infections. *Infect Drug Resist* 15, 1487–1497.
- Zhang, Z., Liu, Y., Zhang, P., Wang, J., Li, D., and Li, Y. 2021. PAAR Proteins Are Versatile Clips That Enrich the Antimicrobial Weapon Arsenals of Prokaryotes. *mSystems* 6, e00953-21.
- Zhao, W., Caro, F., Robins, W., and Mekalanos, J.J. 2018. Antagonism toward the intestinal microbiota and its effect on *Vibrio cholerae* virulence. *Science* 359, 210–213.
- Zhou, M., Lan, Y., Wang, S., Liu, Q., Jian, Z., Li, Y., Chen, X., Yan, Q., and Liu, W. 2020. Epidemiology and molecular characteristics of the type VI secretion system in *Klebsiella pneumoniae* isolated from bloodstream infections. *J Clin Lab Anal* 34, e23459.
- Zoetendal, E.G., von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A.D.L., and de Vos, W.M. 2002. Mucosa-Associated Bacteria in the Human Gastrointestinal Tract Are Uniformly Distributed along the Colon and Differ from the Community Recovered from Feces. *Appl Environ Microbiol* 68, 3401–3407.
- Zoued, A. et al. 2016a. Priming and polymerization of a bacterial contractile tail structure. *Nature* 531, 59–63.

Références bibliographiques

- Zoued, A., Brunet, Y.R., Durand, E., Aschtgen, M.-S., Logger, L., Douzi, B., Journet, L., Cambillau, C., and Cascales, E. 2014. Architecture and assembly of the Type VI secretion system. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1843, 1664–1673.
- Zoued, A., Cassaro, C.J., Durand, E., Douzi, B., España, A.P., Cambillau, C., Journet, L., and Cascales, E. 2016b. Structure–Function Analysis of the TssL Cytoplasmic Domain Reveals a New Interaction between the Type VI Secretion Baseplate and Membrane Complexes. *Journal of Molecular Biology* 428, 4413–4423.
- Zoued, A., Durand, E., Bebeacua, C., Brunet, Y.R., Douzi, B., Cambillau, C., Cascales, E., and Journet, L. 2013. TssK is a trimeric cytoplasmic protein interacting with components of both phage-like and membrane anchoring complexes of the type VI secretion system. *J Biol Chem* 288, 27031–27041.
- Zoued, A., Durand, E., Santin, Y.G., Journet, L., Roussel, A., Cambillau, C., and Cascales, E. 2017. TssA: The cap protein of the Type VI secretion system tail. *BioEssays* 39, 1600262.

ANNEXES



Annexe 1. Récapitulatif des conditions testées en RT-qPCR et explication des choix réalisées. Le milieu utilisé, le temps d'incubation et la température de culture sont reportées entre parenthèses pour chaque condition testée.

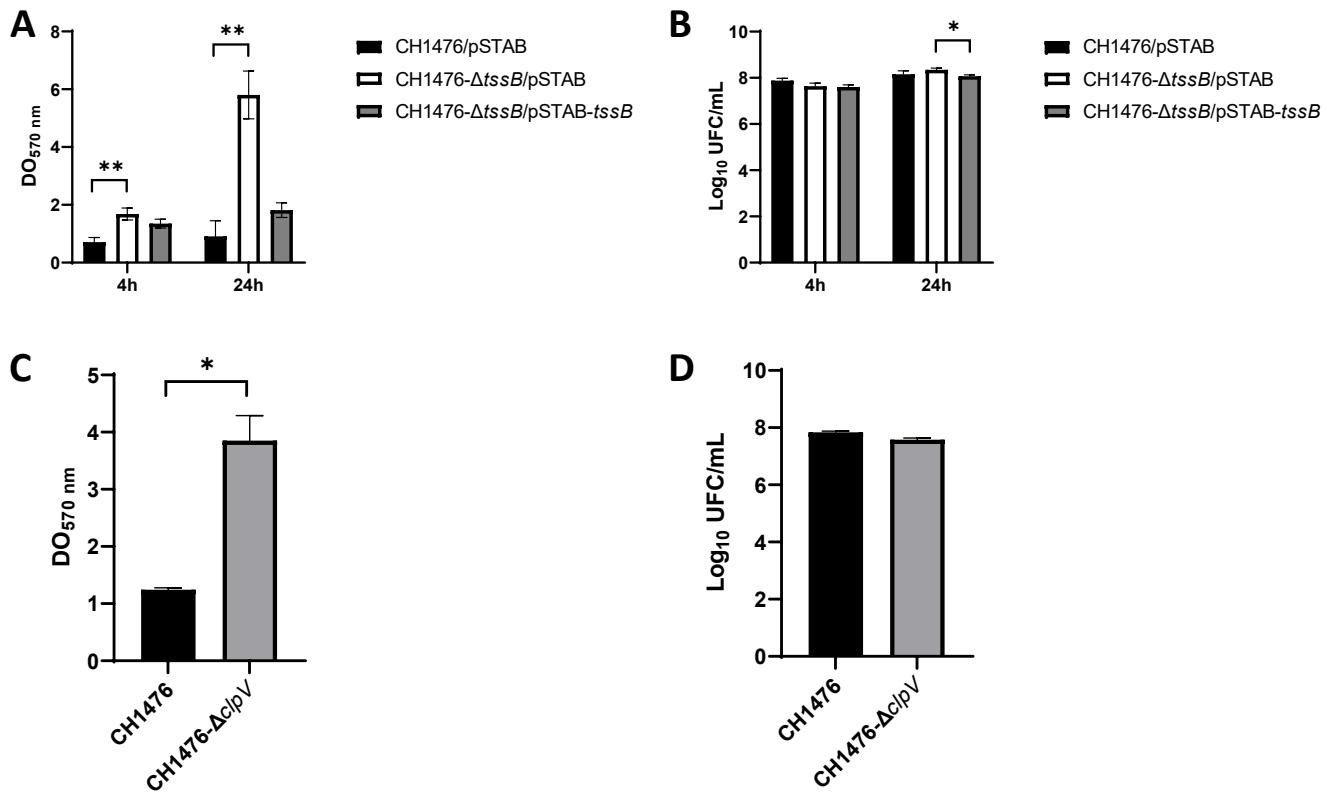
Conditions testées	Intérêt	Référence
Ampicilline sub-inhibitrice (25µg/mL) (LB, O/N, 37°C)	Expression du SST6 par ajout de molécules antimicrobiennes	Liu et al., 2017 Storey et al., 2020
Imipénème sub-inhibitrice (0,25µg/mL) (LB, O/N, 37°C)		
Culture à 25°C (LB, O/N, 25°C)	Régulation par la température	Tao et al., 2016
H ₂ O ₂ 1mM (LB, O/N, 37°C)	Stress oxydatif	Storey et al., 2020
NaCl 595mM (LB, O/N, 37°C)	Stress osmotique	
pH 6 (LB, O/N, 37°C)	Stress acide	
Mucines 3% (LB, ON, 37°C)	Conditions mimant celles du tractus digestif	Bachmann et al., 2015
Sels biliaires 0,2% (LB, O/N, 37°C)		
Co-incubation avec <i>E. coli</i> W3110 (LB, O/N, 37°C)	Expression du SST6 stimulée par contact avec cellules procaryotes ou eucaryotes	
Co-incubation avec milieu conditionné cellules épithéliales TC7 (MEM, O/N, 37°C)		
Arginine 1g/L (LB, O/N, 37°C)	Conditions identifiées <i>in vitro</i> et <i>in silico</i>	
Culture anaérobie (LB, O/N, 37°C)		

Annexe 2. Couple d'amorces utilisés dans cette étude.

Couple d'amorces	Séquences oligonucléotidiques (5' vers 3')	Taille produit PCR (bp)	Utilisation
<i>clpV-FRT-Fw</i>	GTT CCT GTT CAG GAAC AG CG AC GGG CG GT AG CG TG TC GG AA ACA	1615	Synthèse du fragment d'inactivation pour la construction du mutant CH1476-Δ <i>clpV</i>
	ATA AGA GAG AGG AT CT CG CT TG AG CG ATT GT GT TAGG		
<i>clpV-FRT-Rv</i>	GCT TCA CAT CC CTT ACC GAA AGC AGG TG GT GG TT AT GG CT GA ACA		
	ACA AC GAT TT CA CG TG GT CC AT AT GA AT AT CC CT C		
<i>tssB-FRT-Fw</i>	CAT CGT CAC GTT CAC AT CA AAT AT AT CT CA ATA ATT ATT CCT TA AGG	1615	Synthèse du fragment d'inactivation pour la construction du mutant CH1476-Δ <i>tssB</i>
<i>tssB-FRT-Rv</i>	AA AGG AACT GCT GT CT TG AG CG ATT GT GT TAGG		
Système <i>TA-FRT-Fw</i>	TT CT GT GG TA AC AG AC AT TAG C AT TT CC CG GT TA AT CC AT TA AC AG	1615	Synthèse du fragment d'inactivation pour la construction du mutant CH1476-Δ <i>tssB</i>
	ACT TG CCC CG CA CT GG TC CAT AT GA AT AT CCT CC		
Système <i>TA-FRT-Rv</i>	AG C CT GG T CT GG CT GAG T ACC CC CT CT CT CATT ACC CT CA ACC CGA		
	CAG G GAG AGT CCG GT CT TG AG CG ATT GT GT TAGG		
<i>clpV-int-Fw</i>	ACT CCC CG CAG GG T AT GC C TT GC GA AT G ACT TT ATT CAT CG GAT CC		Insertion correcte de la cassette kanamycine dans le mutant CH1476-Δ <i>clpV</i>
	TC CT TG CC CG TT GG TC CAT AT GA AT AT CCT CC		
<i>clpV-int-Rv</i>	GAT GAG GT GG AAA AGG CCC A	99	
	AA AGT CG AT TT CA CG CCC CT		
<i>clpV-ext-Fw</i>	CT CCG AT AG CT GG A AC G A AC	WT : 3325	Insertion correcte de la cassette kanamycine dans le mutant CH1476-Δ <i>clpV</i>
	TC CT GG TA AT GG CG TT CT G	Δ <i>clpV</i> : 2165	
<i>tssB-int-Fw</i>	AAC CT CT CG GT GG CG A AT AC	97	Insertion correcte de la cassette kanamycine dans le mutant CH1476-Δ <i>tssB</i>
	CA AC CT G CT CC CG GT T C AAA A		
<i>tssB-ext-Fw</i>	ATT G C C C CG GT CG T CT CT AT	WT : 1044	Insertion correcte de la cassette kanamycine dans le mutant CH1476-Δ <i>tssB</i>
	CC AT AA AC AC CT G CAT CG CC	Δ <i>tssB</i> : 2047	
Système <i>TA-int-Fw</i>	TG T T T T C G AC GG T AC GGG T	97	Insertion correcte de la cassette kanamycine dans le mutant CH1476-Δ <i>TA</i>
	AT GG T GG C AC G AA AC AA AC G		
Système <i>TA-ext-Fw</i>	TAC G CAC AT T CT CAG T GAC G	WT : 5375	Insertion correcte de la cassette kanamycine dans le mutant CH1476-Δ <i>TA</i>
	CG TT G C C AT T CC AT C ACC AG	Δ <i>TA</i> : 2710	
<i>Ins-tssB-pSTAB-Fw</i>	CAG G AC G C A C T G ACC G A AT T CTT CAA A AT ATT G AT ATT CAT	710	Synthèse de l'insert <i>tssB</i> pour la construction du mutant transcomplémenté CH1476-Δ <i>tssB</i> + pSTAB- <i>tssB</i>
	CCT T G C T GG C AT T GT AC GGG GGT AC C TT AT T C G G G G C A A G C G C A C		
<i>Lin-pSTAB-tssB-Fw</i>	GG T A C C C C C G T A C A AT G C C A	2769	Linéarisation du plasmide pSTAB pour la construction du mutant transcomplémenté CH1476-Δ <i>tssB</i> + pSTAB- <i>tssB</i>
	GA AT T C G G T C A G T G C G T C T G		

<i>Ins-Tle1-Sall-Fw</i>	ATCGTGCCTGACATGTCGAAATAACCGAAAC	2478	Amplification du gène <i>tle1</i> bordé des sites de restriction <i>Sall</i> et <i>HindIII</i>
<i>Ins-Tle1-HindIII-Rv</i>	CGTGCTAACAGCTTCAGACCGTTGTCGTAGAA		
<i>Verif-pBAD33ssOmpA-Fw</i>	AGTGTCTATAATCACGGCAG	pBAD33-ssOmpA : 408	Vérification des constructions dans le plasmide pBAD33 utilisé pour le clonage directionnel
<i>Verif-pBAD33ssOmpA-Rv</i>	GTCAGGTGGGACCACCGCGC	pBAD33-RBS : 344 pBAD33-ssOmpA- <i>tle1</i> : 2844 pBAD33-RBS- <i>tle1</i> : 2781 pBAD33-ssOmpA- <i>tke</i> : 2418 pBAD33-ssOmpA- <i>gfp</i> : 717 pBAD33-ssOmpA- <i>tle1</i> :D301A /pBAD33-ssOmpA- <i>tle1</i> :H379A/pBAD33-ssOmpA- <i>tle1</i> :S252A : 2844	
<i>PCR1F_460</i>	TTACCAGGGTATCTAACCT	460	Vérification de l'extraction ADN avant séquençage 16S
<i>PCR1R_460</i>	TACGGRAGGCAGCAG		
<i>Ins-Tke-Sall-Fw</i>	ATCGTGCgtcgacATGGAACAGTATAACAGTTCA	2028	Amplification du gène <i>tke</i> bordé des sites de restriction <i>Sall</i> et <i>HindIII</i>
<i>Ins-Tke-HindIII-Rv</i>	CGTGCTAACAGCTTAAGGATAATTAAACCCAT		
<i>Tle1-D301A-Fw</i>	GGGCTGCTGGcTACGGTGGCC	pBAD33-ssOmpA- <i>tle1</i> :D301A	Mutagénèse dirigée de <i>tle1</i> (substitution D301A)
<i>Tle1-D301A-Rv</i>	GAGAAACTCCACGCTGACGGG	: 7863	
<i>Tle1-H379-Fw</i>	CCCGGGGATGgccTCGGATATTG	pBAD33-ssOmpA- <i>tle1</i> :H379A	Mutagénèse dirigée de <i>tle1</i> (substitution H379A)
<i>Tle1-H379-Rv</i>	TAAACCACCTCAGTGGCA	: 7863	
<i>Tle1-S252A-Fw</i>	CTATGGTTTgCCCGCGGCC	pBAD33-ssOmpA- <i>tle1</i> :S252A	Mutagénèse dirigée de <i>tle1</i> (substitution S252A)
<i>Tle1-S252A-Rv</i>	ACATACAGCTTGTATGCCTGTCA	: 7863	
<i>pBAD33-GFP-Sall-Fw</i>	ATCGTGCgtcgacATGCGTAAAGGAGAAGAAC	717	Amplification du gène <i>gfp</i> bordé des sites de restriction <i>Sall</i> et <i>HindIII</i> à partir de l'ADN génomique de la souche LM21- Δ shv1:: <i>gfp</i>
<i>pBAD33-GFP-HindIII-Rv</i>	CGTGCTAACAGCTTATTTGTATAGTCATCC		
<i>Prom2-T61-FRT-Fw</i>	AACGAACGCCACCGCGTAATTGCCGTATTCGCGCCGCTG	1615	Synthèse du fragment d'inactivation pour la construction du mutant CH1476 déléter de la région promotrice 2 du SST6-1
<i>Prom2-T61-FRT-Rv</i>	GCGCGCAGGCGACGGCTTGAGCGATTGTGAGG TATTGTTCCGGACACGCTACCGCCGTCGCTGTTCTGAACAGGA ACCCCAAGCGCACATGGTCATATGAATATCCTCC		
<i>Prom2-T61-500Up-Fw</i>	CATGGCAATTCTGTTATC	532	Amplification de 500bp en amont de la région promotrice 2 du SST6-1 à déléter pour recombinaison homologue
<i>Prom2-T61-500Up-Rv</i>	CGTCGCCTCGCGCCAGCGG		
<i>Prom2-T61-500Dw-Fw</i>	TGTGCGCTGGGGTTCTG	519	Amplification de 500bp en aval de la région promotrice 2 du SST6-1 à déléter pour recombinaison homologue
<i>Prom2-T61-500Dw-Rv</i>	ATCAAGCAAGGGCGCAG		

<i>Prom2-T61-Ext-Fw</i>	GATCGTGAAGGCAGTATCGA	WT : 1113	Insertion correcte de la cassette kanamycine
<i>Prom2-T61-Ext-Rv</i>	GCGTCCAGCTGACGCTGGC	ΔPromoteur 2: 2455	dans le mutant CH1476 déléter du promoteur interne du SST6-1
<i>pZE2R-T6SS1-Fw</i>	CATTGCAAACATTCCTTGGTCATTATTGAATTATCATTGAC	1244	Amplification de la région promotrice PR du phage lambda à partir du plasmide pZE2R- <i>gfp</i>
<i>pZE2R-T6SS1-Rv</i>	TGTTTACACACTAGTGCCTGG ATTTCACC AAGAGATAATTGAGATTAATCGCGCCCTGGGGACTTCATTCTGG AACGTATCAGCCATGCGGTACCT TTCTCCTCTT		pour la construction de la souche CH1476-pZE2R1
<i>pZE2R-SST6.1-Up-Fw</i>	CGCCTGAAAAGGAACCATCG	505	Amplification de 500bp en amont de la région promotrice 1 du SST6-1 à déléter pour remplacement par promoteur PR du phage lambda
<i>pZE2R-SST6.1-Up-Rv</i>	TGCACCAAAGGAATGTTGC		
<i>pZE2R-SST6.1-Down-Fw</i>	AGGGCGCGCATTAATCTAA	503	Amplification de 500bp en aval de la région promotrice 1 du SST6-1 à déléter pour remplacement par promoteur PR du phage lambda
<i>pZE2R-SST6.1-Down-Rv</i>	AGCATTTCGGTTAACATCCAT		
<i>Verif-pZE2R-T6SS1-Fw</i>	GCATCGTAGTTCTCGGCCCTT	WT : 1629	Vérification du remplacement de la région promotrice 1 du SST6-1 native par le
<i>Verif-pZE2R-T6SS1-Rv</i>	CATAAACACCTGCATCGCCG	Promoteur PR: 2702	promoteur PR du phage lambda
<i>5-Biot-Pr-T6SS1-Kp</i> <i>3-Prom-T6SS1-Kp</i>	[biotine]-CCGGGCAGACGGCATCGACCTG GCAGCTTCAGCGGCAGTCGACC	858	Amplification de la région promotrice 1 du SST6-1 pour synthèse du promoteur biotinylé utilisé dans l'essai de promoter capture
<i>tssB-int-Fw</i>	AACCTCTCGGTGCCGAATAC	97	RT-qPCR sur le gène <i>tssB</i> (SST6-1)
<i>tssB-int-Rv</i>	CAACCTGCTCCGGTTAAAAA		
<i>tssM2-int-Fw</i>	AGTATCAGCCATCACTGGGG	100	RT-qPCR sur le gène <i>tssM</i> (SST6-2)
<i>tssM2-int-Rv</i>	CCAGTTGACTCCCTGTTGC		
<i>RT-ref-recA-Fw</i>	TTAACACAGGCCGAATTCCAG	100	RT-qPCR sur le gène <i>recA</i> (gène de ménage)
<i>RT-ref-recA-Rv</i>	CCGCTTCTCAATCAGCTTC		
<i>RT-cpxR100pb-Fw</i>	TCGGTCAGGTAGTCTCCCG	100	RT-qPCR sur le gène <i>cpxR</i> (gène de ménage)
<i>RT-cpxR100pb-Rv</i>	GCCGCAGGTTGGAAATATGC		



Annexe 3. Quantification de la biomasse de biofilm et du nombre de CFU par *K. pneumoniae* CH1476 et les différents mutants du SST6 utilisés dans cette étude. La formation de biofilm par la souche CH1476/pSTAB et les mutants respectifs délétérés pour *tssB* (CH1476-Δ*tssB*/pSTAB ; CH1476-Δ*tssB*/pSTAB-*tssB*) est évaluée sur 4h et 24h, en microplaques 24 puits (milieu LB), par (A) coloration au Crystal Violet 0,5% et (B) dénombrement sur milieu solide. Les mêmes manipulations sont réalisées au temps 4h en utilisant la souche CH1476 et le mutant CH1476- Δ*clpV* (C, D). Les résultats sont exprimés en unités DO_{570nm} pour la méthode au Crystal Violet 0,5% (A, C) et en Log₁₀ UFC/mL pour le dénombrement (B, D). Statistiques : Test non paramétrique de Kruskall-Wallis avec test post-hoc de comparaison multiples de Dunn. P<0,05: * ; P<0,01: ** ; P<0,001: ***

Résumé

Klebsiella pneumoniae est un pathogène opportuniste multi-résistant aux antibiotiques, responsable d'infections liées aux soins, souvent consécutives à la colonisation du tractus digestif. Les processus de formation de biofilm sont bien décrits pour ce pathogène, mais les interactions compétitives au sein de communautés microbiennes complexes, comme le microbiote intestinal, restent mal comprises. Les systèmes de sécrétion de type VI (SST6) sont de véritables seringues moléculaires, et sont retrouvés chez plus d'un quart des Protéobactéries. Ils sont impliqués dans la sécrétion et l'injection d'effecteurs toxiques dans des cellules procaryotes et/ou eucaryotes par contact direct, et leur expression est liée à différents stress environnementaux. Le SST6 a été récemment décrit dans des clones hypervirulents de *K. pneumoniae* où il est impliqué dans la virulence et la compétition interbactérienne, mais peu de données concernent les souches classiques de *K. pneumoniae* (cKp). L'objectif de ce travail était d'analyser la prévalence du SST6 et de ses effecteurs dans différents génomes du genre *Klebsiella spp*, d'étudier son rôle dans la colonisation intestinale ainsi que sa régulation transcriptionnelle dans une souche clinique de référence, *K. pneumoniae* CH1157.

Une approche *in silico* a permis d'identifier la présence d'un à quatre opérons SST6 dans 427 génomes de *Klebsiella*, avec une forte prévalence au sein de l'espèce *K. pneumoniae*, indépendamment de l'origine géographique des souches. La présence de deux opérons (SST6-1 et -2) a été mise en évidence dans le modèle d'étude CH1157, contenant respectivement deux gènes codant des effecteurs de type phospholipase (*tle1*) et endopeptidase (*tke*), également identifiés dans d'autres génomes de *K. pneumoniae*. L'expression périplasmique de Tle1 et Tke en système hétérologue chez *E. coli* DH5 α altère la capacité de croissance ainsi que la perméabilité membranaire, ce qui suggère une activité antibactérienne médiée par les effecteurs du SST6 en lien avec un environnement stressant tel que le tractus gastro-intestinal.

L'impact du SST6 sur le microbiote a été étudié dans un modèle murin de colonisation gastro-intestinale avec la souche CH1157 sauvage versus des mutants isogéniques invalidés pour le SST6-1 ($\Delta tssB$ et $\Delta clpV$). Les mutants ont montré une moindre capacité de colonisation du tractus gastro-intestinal à long terme par rapport à la souche sauvage. L'analyse des microbiotes fécaux par séquençage à haut débit de l'ADNr 16S a mis en évidence le rôle du SST6-1 dans la dysbiose du microbiote intestinal 50 jours post-infection, avec un impact sur sa richesse, sa diversité et sa résilience. La présence du SST6-1 est corrélée à une absence spécifique des membres de la famille des Oscillospiraceae. L'activité antibactérienne du SST6 envers des genres ou espèces de cette famille reste cependant à déterminer.

La régulation de l'expression des gènes codant les SST6-1 et -2 est un aspect complexe soulevé dans cette étude. Des sites de fixation pour les régulateurs transcriptionnels ArgR et Fnr ont été identifiés au niveau de la région promotrice du SST6-1, à la fois *in silico* et *in vitro*. Les conditions de régulation de l'expression des SST6 dans les souches cKp restent à élucider mais pourraient faire intervenir des stress rencontrés au niveau du tractus gastro-intestinal tels que la présence d'acides biliaires ou encore le contact de cellules épithéliales.

L'ensemble de ces résultats souligne un rôle majeur du SST6 chez *K. pneumoniae* dans les interactions hôte-pathogène. Il apparaît indispensable de continuer les investigations de ce nouveau facteur de pathogénicité chez *K. pneumoniae* afin de mieux comprendre son implication dans le processus physiopathologique et permettre le développement de stratégies thérapeutiques innovantes à long terme.