



HAL
open science

Colonisation intestinale par *Klebsiella pneumoniae* : mécanismes et stratégies de prévention

Sylvie Miquel

► To cite this version:

Sylvie Miquel. Colonisation intestinale par *Klebsiella pneumoniae* : mécanismes et stratégies de prévention. Bactériologie. Université Clermont Auvergne (UCA), 2024. <tel-04919229>

HAL Id: tel-04919229

<https://hal.science/tel-04919229v1>

Submitted on 29 Jan 2025

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.



HAL Authorization

Université Clermont Auvergne

Rapport d'Activité pour l'obtention de l' Habilitation à Diriger des Recherches

Présentée et soutenue par

Sylvie Miquel

Le 18/12/2024

Colonisation intestinale par *Klebsiella pneumoniae* : mécanismes et stratégies de prévention

Composition du Jury

Rapporteurs :

Dr. JOURNET Laure, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires UMR7255, CNRS-Aix-Marseille Université

Dr. WALIGORA-DUPRIET Anne Judith, Faculté de Pharmacie de Paris, UMR-INSERM S1139, Physiopathologie et Pharmacotoxicologie Placentaire Humaine, Microbiote pré- et post-natal

Pr. ZAHAR Jean-Ralph, Unité de Prévention du risque Infectieux GH Paris Seine Saint-Denis UFR SMBH - Université Paris 13

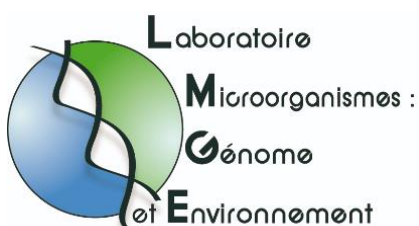
Examineur :

Dr. CHASSARD Christophe, Unité Mixte de Recherche sur le Fromage (UMRF), Aurillac

Garant :

Pr. FORESTIER Christiane, Université Clermont Auvergne, CNRS, LMGE, Clermont-Ferrand

Maître de conférences en Microbiologie (CNU 87), UFR de Pharmacie,
Université Clermont Auvergne, CNRS, LMGE, Clermont-Ferrand



UFR DE PHARMACIE
Université Clermont Auvergne

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury : le Dr. JOURNET Laure, le Dr. WALIGORA-DUPRIET Anne Judith, le Pr. ZAHAR Jean-Ralph et le Dr. CHASSARD Christophe, d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie mon laboratoire d'accueil, le LMGE et surtout le Pr. Christiane Forestier pour m'avoir recrutée au sein de l'équipe CMES. Merci de m'avoir permis de faire de la recherche, de l'enseignement et de co-encadrer des étudiants en thèse, et aussi d'être le garant de cette HDR.

Je remercie avec émotion ceux qui m'ont formée et fait confiance lors de mes précédentes expériences professionnelles. Je pense notamment à Arlette Darfeuille-Michaud, Nicolas Barnich, Philippe Langella et Muriel Thomas.

Comme la recherche est aussi un travail d'équipe, je remercie mes Amis de paille (Adeline Sivignon, Pierre Sauvanet, Frédéric Carvalho et Rebeca Martin-Rosique) mais aussi tous les stagiaires, post-doctorants et évidemment les étudiants en thèse, sans qui rien ne serait possible (Rosyne Largafeuille, Caroline Dausset, Cécile Gosset, Thomas Merciecca et Manjyot Kaur).

Pour terminer, je tiens aussi à remercier tous les gens que j'ai eu la chance de rencontrer au travers de mon travail : mes partenaires (Eric Cascales, Olaya Rendueles Garcia, Stéphanie Bornes), les collègues enseignants des différentes composantes (Claire, Christine, Eric), les collègues des différents laboratoires d'accueil, particulièrement ceux avec qui je partage la convivialité d'un café matinal depuis 10 ans (Valérie, Laurence, Damien, Marjolaine, Patricia et Marie Pierre), et autres membres de CMES (Philippe, Isabelle, Geneviève, Claire, Ousmane et Bertrand).

Pour terminer, je souhaite remercier ma famille, mes amis (ils ne sont pas très nombreux et se reconnaîtront) et évidemment Nicolas, Gabin, Joséphine et Malcie.

Table des matières

Liste des Figures et des Tableaux	6
Curriculum Vitae	8
1.1. Fonctions universitaires	8
1.2. Formation et Diplômes universitaires	9
♦ Parcours professionnel et universitaire	9
♦ Formations professionnelles	10
♦ Participation à des Associations et Comités	10
♦ Missions d'intérêt général	10
1.4. Participations à des programmes scientifiques	11
Activités pédagogiques et d'encadrement	12
2.1 Activités pédagogiques	12
♦ Composantes, heures et effectifs	12
♦ Descriptif de l'enseignement	13
♦ Responsabilités d'enseignement	15
2.2. Activités d'encadrement	15
♦ Thèse de Doctorat	15
♦ Master 2	16
♦ Autres formations	16
♦ Thèse d'exercice de Pharmacie	16
2.3. Participation à des Jurys de thèse	17
♦ Jurys de thèse d'université	17
♦ Jury de thèses d'exercice Pharmacie	17
2.4. Participation à des Comités de thèse	18
Liste des publications	19
3.1. Publications dans des journaux à comité de lecture	19
♦ Articles originaux	19
♦ Revues	21
♦ Ouvrages	22
♦ Brevets	22
3.2. Diffusion des travaux	22
♦ Communications orales :	22
♦ Communications affichées	24
Thématiques de recherche	27
Partie 1 Travaux antérieurs à mon intégration dans l'UMR CNRS 6023	27
1.1. Thèse de doctorat	27
a. Etude de la régulation de l'expression de facteurs de pathogénicité	28
b. Séquence et analyse du génome de la souche de <i>E. coli</i> adhérente et invasive isolée de patient atteint de maladie de Crohn.	30
1.2. Recherches post-doctorales	32

a. Projet collaboratif FParis _____	33
b. Etude des mécanismes d'action impliqués dans les effets santé bénéfiques de <i>Faecalibacterium</i> ____	35
♦ <i>Faecalibacterium</i> participe à l'homéostasie de l'épithélium colique _____	36
♦ <i>Faecalibacterium</i> protecteur de l'épithélium colique lors d'une colite induite chimiquement _____	37
Partie 2 Travaux réalisés depuis mon intégration dans l'UMR 6023 _____	40
2.1. Modes d'action de bactéries bénéfiques _____	40
a. Effet de la souche <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> Lcr35 _____	40
b. Etude des modes de vie de souches de Lactobacilles d'intérêt _____	43
2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> : modèle d'étude d'un pathogène opportuniste capable de former du biofilm	45
a. Activités anti-biofilm de bactéries probiotiques vis-à-vis de pathogènes opportunistes _____	46
b. Colonisation intestinale : facteurs de pathogénicité de <i>K. pneumoniae</i> et dysbiose _____	48
Partie 1 Comprendre les mécanismes moléculaires régissant la colonisation intestinale par <i>K. pneumoniae</i> : Rôles des SST6 _____	52
1.1 Régulation de l'expression des SST6 de <i>K. pneumoniae</i> _____	52
♦ Résultats préliminaires _____	52
♦ Perspectives d'étude _____	55
1.2 Caractérisation des cibles des T6SSs de <i>K. pneumoniae</i> _____	55
a. Quelles sont les proies bactériennes ciblées par les T6SS de <i>K. pneumoniae</i> dans le microbiote intestinal ? _____	56
b. Quel est le rôle du mode de vie « biofilm » ? _____	58
♦ Résultats préliminaires _____	58
♦ Perspectives d'étude _____	59
Partie 2 : De la colonisation à l'infection _____	61
2.1. Caractérisation d'une collection de souches cliniques _____	61
♦ Résultats préliminaires _____	61
♦ Perspectives d'étude _____	62
2.2. Rôles des SST6 dans les interactions hôte/pathogène _____	63
a. Interactions <i>K. pneumoniae</i> / cellules épithéliales intestinales ? _____	64
b. Interactions <i>K. pneumoniae</i> / macrophages : modulation de la phagocytose ? _____	65
2.3. Modèles murins de colonisation intestinale mimant le contexte physiopathologique des patients atteints d'infection à <i>K. pneumoniae</i> _____	66
a. Impact du T6SS de <i>K. pneumoniae</i> vis-à-vis des bactéries commensales participant à la résistance à la colonisation _____	66
b. Rôles de l'alimentation dans la colonisation intestinale par <i>K. pneumoniae</i> ? _____	67
Partie 3 : Limiter la colonisation intestinale : développer des stratégies prophylactiques et/ou thérapeutiques innovantes _____	70
3.1. Stratégies ciblant le SST6 _____	70
a. Immunisation ou blocage direct _____	70
b. Enrichissement du microbiote intestinal : attaquer ou résister ? _____	71
Conclusion _____	72
Références bibliographiques _____	73
Annexes _____	81

Annexe 1 : Role of <i>Klebsiella pneumoniae</i> Type VI secretion system (T6SS) in long-term gastrointestinal colonization _____	81
Annexe 2 : Within-host evolution of <i>Klebsiella pneumoniae</i> from intestinal carriage to bacteremia ____	81

Liste des Figures et des Tableaux

Tableau 1. Récapitulatif du service d'enseignement.

Tableau 2. Valorisation scientifique.

Figure 1. Modèle de régulation coordonnée de la synthèse de flagelles et des pili de type 1 dépendante du c-di-GMP.

Figure 2. Couplage de la co-régulation flagelles/pili de type 1 par la protéine de type histone Fis.

Figure 3. Caractérisation génomique et de la virulence de la souche de référence AIEC LF82.

Figure 4. *Faecalibacterium*, des souches aux capacités anti-inflammatoires et anti-nociceptives.

Figure 5. Etude du rôle des bactéries, commensales en modèle gnotobiotique, sur l'homéostasie intestinale vis-à-vis de la production de mucus.

Figure 6. Approche métabolomique pour la caractérisation des capacités anti-inflammatoires de la souche de référence *F. duncaniae* A2-165.

Figure 7. Mécanismes d'action antifongique de la souche probiotique *L. rhamnosus* Lcr35.

Figure 8. Méthode permettant l'étude mécanistique du mode de vie d'une souche de *Lactobacillus crispatus*

Figure 9. Modèles murins de colonisation et d'infection à *K. pneumoniae* développés au laboratoire. A. Colonisation intestinale après gavage.

Figure 10. Rôle du Système de sécrétion de type VI (T6SS) de *K. pneumoniae* dans la colonisation gastro-intestinale.

Figure 11. Régions promotrices du SST6-1 de la souche *K. pneumoniae* CH1157.

Figure 12. Modélisation 3D des potentielles toxines associées aux SST6 de la souche *K. pneumoniae* CH1157.

Curriculum Vitae

Sylvie Miquel

Date de Naissance : 16 avril 1983, à Marvejols (48)

Situation personnelle : Pacsée, trois enfants

Nationalité : Française

Adresse Personnelle :

27, avenue du Mont Dore

63110 Beaumont

Adresse Professionnelle :

28, place Henri Dunant

63000 Clermont-Ferrand

Tél. : 0473177998

E-mail : sylvie.miquel@uca.fr

1.1. Fonctions universitaires

Depuis septembre 2015 : Maître de conférences (MCU) en Bactériologie : UFR de Pharmacie (Université Clermont Auvergne) / UMR CNRS 6023, Laboratoire Microorganismes : Génome Environnement, Clermont-Ferrand

2014-2015 : Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER) (temps complet) : UFR de Pharmacie (Université d'Auvergne) / UMR CNRS 6023, Laboratoire Microorganismes : Génome Environnement, Clermont-Ferrand

2009-2010 : Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER) (temps complet) : Institut Universitaire de Technologie (IUT) option Analyses Biologiques et Biochimiques (ABB) et option Diététique, Université d'Auvergne.

2006-2009 : Monitorat à l'Institut Universitaire de Technologie (IUT) option Analyses Biologiques et Biochimiques (ABB) et option Diététique, Université d'Auvergne.

1.2. Formation et Diplômes universitaires

♦ *Parcours professionnel et universitaire*

2011-2013 : Post-doctorat : INRA, Institut MICALIS « Microbiologie de l'Alimentation au service de la Santé », Equipe ProbiHôte, Jouy-en-Josas, France (Dr. Philippe Langella)

- **Projet :** Nouvelle génération de compléments alimentaires à effet positif prouvé sur le syndrome de l'intestin irritable chez l'homme (FUI FParis).

2010 : Doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé option Microbiologie (allocation de recherche MENRT), Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand. Laboratoire : Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte (M2iSH), UMR 1071 Inserm / UdA / USC 2018 INRA, Clermont-Ferrand, France (Directeur : Dr. Laurent Claret)

- **Titre :** Facteurs de virulence d'*Escherichia coli* adhérents et invasifs associés à la maladie de Crohn : caractérisation et régulation de leur expression.

2006 : Master Recherche Génétique et Physiologie, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.

- **Stage** (6 mois) Laboratoire de Pathogénie Bactérienne Intestinale, JE2526, Université d'Auvergne-Clermont I ; **Titre :** Rôle des protéines de type-histone dans le pouvoir d'adhésion et d'invasion de *Escherichia coli* associées à la maladie de Crohn

2005 : Maîtrise Biologie Cellulaire et Physiologie, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.

- **Stage** (3 mois) Biogemma UK (Cambridge) ; **Titre :** Efficacité du mécanisme d'ARN interférence chez *Brassica napus*.

2004 : Licence de Biologie Cellulaire et Physiologie, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.

2003 : Diplôme Universitaire de Technologie, Génie Biologique option Analyses Biologiques et Biochimiques, Université d'Auvergne.

- **Stage** au Laboratoire de Biologie des Protistes UMR CNRS 6023 à l'Université Blaise Pascal Aubière.

♦ *Formations professionnelles*

2013 à 2023 : Expérimentation animale : Niveau 1 concepteur et suivi régulier des compétences (Oniris Nantes)

2022 : Formation « Se préparer à encadrer efficacement » (UCA)

2021 : Formation « Ethique et intégrité scientifique » (UCA)

2021 : Formation à l'outil en ligne Wooclap (UCA)

2014 : Formation à la conduite des autoclaves (Apave)

♦ *Participation à des Associations et Comités*

- Membre de l'**ARBV** (Association pour la Recherche en Bactériologie et Virologie)
- Membre de la **SFM** (Société Française de Microbiologie).
- Membre de l'**AEMIP** (Association des Enseignants de Microbiologie et d'Immunologie des Facultés de Pharmacie)
- Membre de la Fédération de Recherche en Microbiologie **SysMic** (Systèmes Microbiens)
- Participation à l'activité de recherche clinique en microbiologie fédérée au sein de l'axe Infection Inflammation et Interaction Hôtes Pathogènes (**3 IHP**) qui s'articule autour de 8 services hospitaliers du CHU de Clermont-Ferrand.
- Membre du comité **SBEA** (Structure chargée du Bien Etre des Animaux) à l'Université Clermont Auvergne (depuis 2023)

♦ *Missions d'intérêt général*

- Co-Responsable de matériel commun sur la **plateforme de culturomique** (SysMic et UCA partner) : CellZScope et Chambre anaérobie
- Participation à l'évaluation 2023 **CidPHARMef** (Conférence Internationale des Doyens des facultés de pharmacie d'Expression Française) : groupe de travail Formation continue

- Participation à des **jurys de recrutement**
 - . CDD techniciens
 - . Concours Adjoint technique BAP A (Clermont-Ferrand, 2023)
 - . Concours Maître de Conférences des Universités (Section CNU 87 Rennes, 2024)
 - Commission de recrutement Mon Master
- **Animation Table Ronde**, Probiotiques et prébiotiques, Journées collaboratives, Lyon Biopôle, 11 octobre 2016, Grenoble, France.
- **Expertise d'articles scientifiques** pour les journaux à comité de lecture (environ 10 / an) et pour Agence Nationale de la Recherche (ANR ; CE14 - Physiologie et physiopathologie)
- Animation et organisation des réunions de laboratoire hebdomadaires
- Présidence de Jury Baccalauréat (général et technologique) session 2018 Clermont-Ferrand
- Participation Jury M1, M2 et JED (Journées École doctorale SVSAE)

1.4. Participations à des programmes scientifiques

Contrat avec les collectivités territoriales en tant que porteur : Appel d'offre PROJET EMERGENCE 2018-2019, I-SITE Clermont, CAP 2025 : « Rôle du système de sécrétion de type 6 de *Klebsiella pneumoniae* dans les interactions bactériennes au sein de communautés complexes. ». (30 000 euros)

Participation à un projet inter-équipe du LMGE (2023) : S'approprier et se former à la technologie de PCR digitale. (5 000 euros)

Participation au consortium européen FunHoMic (Fungus Host Microbiota) : avec la Société Biose/NexBiome (Clermont Ferrand) et dans le cadre d'un MSCA European Innovative Training Network « Deciphering the fungus-host-microbiota interplay to improve the management of fungal infections » FunHoMic 2020, bourse pour un ingénieur d'Etude 24 mois.

Activités pédagogiques et d'encadrement

2.1 Activités pédagogiques

♦ Composantes, heures et effectifs

Mon enseignement concerne principalement la Microbiologie fondamentale et clinique. Il se décompose sous la forme de CM, TD et TP (formation initiale présentielle) dans diverses formations (**Tableau 1**).

Tableau 1. Récapitulatif du service d'enseignement

Formation	Niveau	Unité d'enseignement	Nombre d'étudiant	CM (h)	TD (h)	TP (h)
Pharmacie	DFGSP2	Infectiologie	100			26
		Biotechnologie	100			18
		Le Parcours d'Orientation Professionnelle	11		7	
		Activité recherche	2		2	
	DFGSP3	Initiation recherche et bibliographie	4		4	
	DFASP1	Stratégies anti-infectieuses	100			12
	DFASP2	Probiotiques et allégations santé	30	6	3	4
	Cycle court	Thèse d'exercice			4	
Licence	Licence 3 Professionnelle « Industries pharmaceutiques, cosmétologiques et de santé : gestion, production et valorisation »	Fondamentaux de la bactériologie, risque infectieux, contaminations et suivi de stage	30	6	6,5	10
	Licence 3 option Pharmacologie et nutrition	Microbiologie médicale	100	12		24
	LAS2 Chimie	Fondamentaux de la bactériologie	25	3	3	
Master Microbiologie	Master 1	Génétique bactérienne	40	3	3	
	Master 2	Encadrement projets tutorés	4		12,5	
		Aspects moléculaires de la virulence des microorganismes	40	4,5	4,5	
Total équivalent TD				51,75	74,25	94

DFGSP : Diplôme de Formation Générale en Sciences Pharmaceutiques, **DFASP** : Diplôme de Formation Approfondie en Sciences Pharmaceutiques, **LAS** : Licences Accès Santé, **CM** : Cours Magistraux, **TD** : Travaux Dirigés, **TP** : Travaux Pratiques.

♦ *Descriptif de l'enseignement*

Enseignement effectué à l'UFR de Pharmacie et à l'UFR de Biologie sur la base de 192 heures équivalent TD :

- **Cours Magistraux « Microbiologie générale et médicale »** : Microbiologie médicale en Licence Sciences Technologie Santé, Licence Professionnelle Développement, production et ingénierie pharmaceutique 3ème année (L3), LAS2 chimie et Master Microbiologie (M1 et M2).
- **Travaux Pratiques de Microbiologie (qualité et biotechnologie)** : Qualité microbiologique (produits alimentaires et pharmaceutiques) (L3), Microbiologie générale, Biotechnologies (DFASP2) et antibiotiques (DFASP1)
- **Travaux Dirigés** : Projet bibliographique (M2 Microbiologie), POP : Projet d'Orientation Professionnelle en Pharmacie, préparation à l'internat (DFASP2), analyse de données (M1, M2 Microbiologie et LAS2 chimie)

Au cours de ces dernières années, j'ai fait évoluer mon enseignement en assurant plus de cours magistraux, notamment auprès des étudiants en Master Microbiologie. J'interviens ainsi dans l'Unité d'Enseignement (UE) « Génomes Microbiens » pour les étudiants en Master 1 (3h CM et 3h TD) où j'aborde les notions de transferts horizontaux de gènes et les caractéristiques des plasmides (régulation, ségrégation et intérêts biotechnologiques). Avec les étudiants de Master 2, j'interviens depuis 2023-2024 dans l'UE « Aspects moléculaires de la virulence des microorganismes » (4,5h CM et 4,5h TD) en abordant la « colonisation bactérienne » via « les modèles d'études des microbiotes ». Ces sujets sont en relation directe avec ma thématique de recherche, ce qui me permet de partager mes questionnements avec les étudiants et les initier à la critique d'articles scientifiques. Enfin, je participe depuis plusieurs années à l'UE « Projet bibliographique » du Master 1 au sein de laquelle j'encadre un ou deux binômes pour la rédaction d'un manuscrit et la présentation orale d'un projet sur la thématique de leur choix en bactériologie. Cette UE me permet d'avoir des échanges concrets, réguliers et en groupe restreint avec des étudiants que j'accompagne dans leur réflexion pendant plusieurs mois.

J'ai eu l'opportunité de créer une nouvelle Unité d'Enseignement (UE) « Probiotiques et Allégations santé » pour les étudiants de pharmacie DFASP2 filière officine sur le thème des probiotiques et allégations santé. Cet enseignement, composé de CM, TP et TD apporte un plus aux futurs pharmaciens pour le conseil aux patients. La mise en place de cette UE en 2018 m'a conduit à proposer une Formation Continue (FC) sur la même thématique aux professionnels de santé ; formation que je pilote et à laquelle participent un intervenant en galénique ainsi qu'un médecin gastro-entérologue.

De plus, j'ai récemment participé, avec une enseignante MCU associée d'officine et des médecins dermatologues, à la création d'une autre FC « eczéma et dermatite atopique » qui est proposée aux pharmaciens d'officine depuis l'automne 2024. Mon apport consiste en une présentation de l'utilisation des probiotiques pour le traitement de pathologies cutanées.

J'ai aussi eu la volonté au cours de mon parcours de faire évoluer le contenu des séances de TP en proposant des manipulations en parfaite adéquation avec les cours. Par exemple, j'ai mis au point un TP sur les biofilms permettant aux étudiants de L3 Sciences de la vie option pharmacologie de visualiser ce mode de vie bactérien et d'apprécier sa résistance aux antibiotiques. J'ai également conçu une séance de TP nécessitant l'utilisation de la pharmacopée européenne pour tester la qualité microbiologie de produits pharmaceutiques avec des étudiants de Licence Professionnelle « Industries pharmaceutiques, cosmétologiques et de santé : gestion, production et valorisation ». Enfin, avec un collègue MCU en biotechnologie, nous avons mis en place depuis quelques années une séance de TP sur la production par biofermentation d'un composé actif (l' α -amylase) par *Bacillus amyloliquefaciens*. Ces TP (proposés les années précédentes en DFASP2 de façon optionnel) ont été adaptés depuis 2020 au tronc commun DFGSP2, ce qui a entraîné une multiplication des séances (environ 100 étudiants).

Concernant les TD, j'essaie de les rendre attractifs sous forme d'analyse de publications (M1 et M2) ou d'« Escape Game » identification bactérienne (LAS2 chimie). J'interviens assez largement dans le suivi individuel des étudiants (stages, thèses d'exercice, POP), ce qui me permet de rester proche d'eux et de mieux comprendre leurs attentes.

J'exerce exclusivement un enseignement en microbiologie. Globalement, j'essaie d'apporter aux étudiants de nouvelles connaissances en microbiologie fondamentale ou sur des thématiques de recherche en utilisant des documents bibliographiques. Cet enseignement est

dispensé à divers étudiants du cursus pharmacie, de licence Sciences de la vie et de Master Microbiologie. Je cherche à adapter mon discours à mon auditoire en fonction de son niveau. J'essaie d'avoir une oreille attentive à leurs difficultés et de faire évoluer leurs compétences par un échange professionnel notamment lors de mes heures de TP.

♦ *Responsabilités d'enseignement*

- **Responsabilités d'UE :**

- Probiotiques et allégations santé (DFASP2). UE proposée depuis 5 ans aux étudiants orientation officine.

- Microbiologie Médicale (L3 Parcours Pharmacologie et Nutrition), septembre 2024

- Contrôles microbiologiques des produits stériles et non stériles (Licence Développement, production et ingénierie pharmaceutique 3ème année)

- **Responsable d'une Formation Continue** (proposée à partir de 2022) : Microbiotes et Souches Probiotiques

2.2. Activités d'encadrement

♦ *Thèse de Doctorat*

- **Rosyne Lagrafeuille**, "Effet anti-biofilm de bactéries probiotiques" Financement : Bourse Région Cluster Institut Recherche Probiotiques. sept 2013-oct 2016, (Taux d'**encadrement 30%**, C. Forestier 70%).

- **Thomas Merciecca**, « Système de sécrétion de type VI chez *K. pneumoniae* : dialogue moléculaire et/ou arme antibactérienne ? » Financement : Allocation ministérielle, octobre 2019-sept 2022, (Taux d'**encadrement 50%**, C. Forestier 50%).

- **Manjot Kaur**, « Development of effective procedures to numerate viable bacteria forming aggregates in liquid cultures », décembre 2022- 2025, Financement : Universitaire/industriel Biose, (Taux d'**encadrement : 30%**, C. Dausset 30% et C. Forestier 40%).

♦ *Master 2*

- **Lucie Laffet** (2018) : MASTER 2 UCA : Microbiologie Parcours : Génome, Ecologie et Physiologie Microbienne, (**taux d'encadrement 50%**, C. Forestier 50%).).
- **Thomas Merciecca** (2019) : MASTER 2 UCA : Microbiologie Parcours : Génome, Ecologie et Physiologie Microbienne, (**taux d'encadrement 100%**).
- **Cécile Gosset** (2021) : Année Recherche, MASTER 2 UCA : Microbiologie Parcours : Génome, Ecologie et Physiologie Microbienne, Financement Année Recherche (**taux d'encadrement 100%**).

♦ *Autres formations*

- **Master I** : 7 stages (Bonneau Samuel, 2015 ; Malvina Saint-Jean, 2016 ; Ludovic Martins, 2018 ; Genest Anais, 2020 ; Julien Coralie, 2022 ; Lafnouch Asmaa, 2023, Zoghلامي Maram, 2024)
- **DUT** : 3 stages (Besse Sophie, 2009 ; Besnard Celine, 2019 ; Correia Kelly, 2019)
- **BUT 2** : 1 stages (Caudal Manon, 2024)
- **BTS** : 2 stages (Boyer Manon, 2017 ; Le Guily Kyllian, 2020)
- **Ingénieur** : 1 stage (Beaumont Martin, 2012)

♦ *Thèse d'exercice de Pharmacie*

- **Annabelle Salas**, « *Clostridioides difficile* et les perturbations du microbiote intestinal », UCA, UFR Pharmacie. Soutenance Septembre 2020.
- **Caroline Troubat**, « Pathologies digestives du nouveau-né et du nourrisson : quel rôle pour les probiotiques ? », UCA, UFR Pharmacie. Soutenance Novembre 2020.
- **Amandine Chatillon**, « La dysbiose du microbiote intestinal due à la prise d'antibiotiques », UCA, UFR Pharmacie, Partenariat BICODEX. Soutenance Juin 2021.
- **Camille Estival**, « Le microbiote intestinal : cible thérapeutique de l'épisode dépressif caractérisé ? », UCA, UFR Pharmacie. Soutenance Mars 2023.

2.3. Participation à des Jurys de thèse

♦ *Jurys de thèse d'université*

- **Lopez-Siles Mireia**, “Ecophysiology and phylogeny of *Faecalibacterium prausnitzii* in healthy and diseased gut. Application in Inflammatory Bowel Disease diagnostics.” Department of Biology, Laboratory of Molecular Microbiology, Universitat de Girona, Espagne; Soutenance Janvier 2015, S. Miquel Examineur.

- **Cornuault Jeffrey**, « Impact des phages tempérés sur la stabilité du microbiote intestinal : la lysogénie n'est pas un long fleuve tranquille », Université Paris-Saclay préparée à AgrosParisTech, France, Soutenance, Septembre 2018, S. Miquel Examineur.

- **Mathieu Elliot**, « Isolement de souches bactériennes à partir de la cavité buccale de nouveau-nés et caractérisation de leurs effets en santé respiratoire », Sorbonne Université préparée à l'institut MICALIS UMR 1319, INRAE, France, Soutenance, Juin 2020, S. Miquel Examineur.

- **Botchorichvili Hélène**, « Contribution des effecteurs du système de sécrétion de type VI à la pathogénicité des *Escherichia coli* adhérents invasifs chez les patients atteints de la maladie de Crohn », UCA préparée au laboratoire M2iSH, UMR 1071 Inserm, INRAE USC 1382, France, Soutenance, Septembre 2024, S. Miquel Examineur.

♦ *Jury de thèses d'exercice Pharmacie*

- **Justine Savinel**, « Traitement des troubles digestifs liés à une dysbiose intestinale », Diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie, UCA, UFR Pharmacie, Clermont-Ferrand, France, Soutenance, mars 2018.

- **Ophélie Braujean**, « Topiques et microbiote cutané », Diplôme d'État de docteur en Pharmacie, UCA, UFR Pharmacie, Clermont-Ferrand, France, Soutenance, novembre 2019.

- **Samuel Bonneau**, « Nourrir le monde de demain : avantages et risques de l'entomophagie », Diplôme d'État de docteur en Pharmacie, UCA, UFR Pharmacie, Clermont-Ferrand, France, Soutenance, octobre 2020.

- **Arnaud Delforge**, « Infections urogénitales : rôle du microbiote et usage des probiotiques dans la prise en charge des patients à l'officine », Diplôme d'État de docteur en Pharmacie, UCA, UFR Pharmacie, Clermont-Ferrand, France, Soutenance, juin 2024.

2.4. Participation à des Comités de thèse

- **Amélie Lopez**, ED SVSAE, Laboratoire M2iSH, U 1071, Clermont-Ferrand.
- **Elodie Baudu**, ED SVSAE, Laboratoire NeuroDol, U 1107, Clermont-Ferrand.
- **Elodie Gimier**, ED SVSAE, Laboratoire M2iSH, U 1071, Clermont-Ferrand.
- **Elodie Picard**, ED SVSAE, Laboratoire NeuroDol, U 1107, Clermont-Ferrand
- **Maeva Meynier**, ED SVSAE, Laboratoire M2iSH, U 1071 et Laboratoire NeuroDol, U 1107, Clermont-Ferrand.
- **Camille Kropp**, ED ABIES, Institut MICALIS, INRAE, Jouy en Josas.
- **Hélène Botchorichvili**, ED SVSAE, Laboratoire M2iSH, U 1071, Clermont-Ferrand.
- **Fanny De Clercq**, ED SVSAE, Laboratoire M2iSH, U 1071, Clermont-Ferrand, (2022-2025).
- **Flavie Dambrine**, ED SVSAE, Laboratoire M2iSH, U 1071, Clermont-Ferrand, (2022-2025)

Liste des publications

3.1. Publications dans des journaux à comité de lecture

Le **tableau 2** résume l'ensemble de mes apports en termes de publications, et les noms des étudiants co-encadrés sont indiqués en gras.

Tableau 2. Valorisation scientifique

	Nombre
Articles originaux	22
Premier ou deuxième auteur	13
Denier auteur	1
Avec un étudiant co-encadré	2
Brevet	1
Revue, Chapitres de livres	10
Avec un étudiant co-encadré	2
Communications orales	19
Orateur	7
Non orateur	13
Communications affichées	27
Premier auteur	15
Associées	13

♦ *Articles originaux*

1. Claret L, Miquel S, Vieille N, Ryjenkov DA, Gomelsky M, Darfeuille-Michaud A. The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2007 Nov 16;282(46):33275–83.
2. Miquel S, Claret L, Bonnet R, Dorboz I, Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Role of decreased levels of Fis histone-like protein in Crohn's disease-associated adherent invasive *Escherichia coli* LF82 bacteria interacting with intestinal epithelial cells. *J Bacteriol*. 2010 Apr;192(7):1832–43.
3. Miquel S, Peyretailade E, Claret L, de Vallée A, Dossat C, Vacherie B, *et al*. Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PloS One*. 2010;5(9).
4. Wrzosek L, Miquel S, Noordine M-L, Bouet S, Joncquel Chevalier-Curt M, Robert V, *et al*. *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*. 2013;11:61.

5. Martín R, Chain F, Miquel S, Lu J, Gratadoux J-J, Sokol H, *et al.* The commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models. *Inflamm Bowel Dis.* 2014 Mar;20(3):417–30.
6. Martín R, Chain F, Miquel S, Natividad JM, Sokol H, Verdu EF, *et al.* Effects in the use of a genetically engineered strain of *Lactococcus lactis* delivering in situ IL-10 as a therapy to treat low-grade colon inflammation. *Hum Vaccines Immunother.* 2014;10(6):1611–21.
7. Laval L, Martin R, Natividad JN, Chain F, Miquel S, Desclée de Maredsous C, *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 and the commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 exhibit similar protective effects to induced barrier hyper-permeability in mice. *Gut Microbes.* 2015;6(1):1–9.
8. Martín R, Miquel S, Chain F, Natividad JM, Jury J, Lu J, *et al.* *Faecalibacterium prausnitzii* prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model. *BMC Microbiol.* 2015;15(1):67.
9. Miquel S, Leclerc M, Martin R, Chain F, Lenoir M, Raguideau S, *et al.* Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii*. *mBio.* 2015;6(2).
10. Quévrain E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J, *et al.* Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut.* 2015 Jun 4;
11. Aranas T, Grosfeld A, Poitou C, Omar AA, Le Gall M, Miquel S, *et al.* Lipid-rich diet enhances L-cell density in obese subjects and in mice through improved L-cell differentiation. *J Nutr Sci.* 2015;4:e22.
12. Miquel S, Martín R, Lashermes A, Gillet M, Meleine M, Gelot A, *et al.* Anti-nociceptive effect of *Faecalibacterium prausnitzii* in non-inflammatory IBS-like models. *Sci Rep.* 2016;6:19399.
13. Martín R, Laval L, Chain F, Miquel S, Natividad J, Cherbuy C, *et al.* *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* CNCM-I2494 Restores Gut Barrier Permeability in Chronically Low-Grade Inflamed Mice. *Front Microbiol.* 2016;7:608.
14. Martín R, Miquel S, Benevides L, Bridonneau C, Robert V, Hudault S, *et al.* Functional Characterization of Novel *Faecalibacterium prausnitzii* Strains Isolated from Healthy Volunteers: A Step Forward in the Use of *F. prausnitzii* as a Next-Generation Probiotic. *Front Microbiol.* 2017;8:1226.
15. Benevides L, Burman S, Martin R, Robert V, Thomas M, Miquel S, *et al.* New Insights into the Diversity of the Genus *Faecalibacterium*. *Front Microbiol.* 2017;8:1790.

16. **Lagrafeuille R, Miquel S, Balestrino D, Vareille-Delarbre M, Chain F, Langella P, et al.** Opposing effect of *Lactobacillus* on *in vitro* *Klebsiella pneumoniae* in biofilm and in an *in vivo* intestinal colonisation model. *Benef Microbes*. 2018 Jan 29;9(1):87–100.
17. Guilhen C, Miquel S, Charbonnel N, Joseph L, Carrier G, Forestier C, et al. Colonization and immune modulation properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilm-dispersed cells. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2019;5:25.
18. Vareille-Delarbre M, Miquel S, Garcin S, Bertran T, Balestrino D, Evrard B, et al. Immunomodulatory Effects of *Lactobacillus plantarum* on Inflammatory Response Induced by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*. 2019;87(11).
19. Dausset C, Bornes S, Miquel S, Kondjoyan N, Angenieux M, Nakusi L, et al. Identification of sulfur components enhancing the anti-*Candida* effect of *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35. *Sci Rep*. 2020 13;10(1):17074.
20. Miquel S, Verlaguet J, Garcin S, Bertran T, Evrard B, Forestier C, et al. *Lacticaseibacillus rhamnosus* Lcr35 Stimulates Epithelial Vaginal Defenses upon *Gardnerella vaginalis* Infection. *Infect Immun*. 2022 Sep 15;90(9):e0030922.
21. **Merciecca T, Bornes S, Nakusi L, Theil S, Rendueles O, Forestier C and Miquel S.** Role of *Klebsiella pneumoniae* Type VI secretion system (T6SS) in long-term gastrointestinal colonization. *Sci Rep*. 2022 Oct 10;12(1):16968.
22. **Kaur M, Miquel S, Ollivier-Nakusi L, Thorat C, Vareille-Delarbre M, Bekirian C, et al.** Elemental sulfur enhances the anti-fungal effect of *Lacticaseibacillus rhamnosus* Lcr35. *Microbes Infect*. 2023 Dec 30;105286.

♦ *Revues*

1. Miquel S, Martín R, Rossi O, Bermúdez-Humarán LG, Chatel JM, Sokol H, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol*. 2013 Jun;16(3):255–61.
2. Martín R, Miquel S, Ulmer J, Kechaou N, Langella P, Bermúdez-Humarán LG. Role of commensal and probiotic bacteria in human health: a focus on inflammatory bowel disease. *Microb Cell Factories*. 2013;12:71.
3. Martín R, Miquel S, Langella P, Bermúdez-Humarán LG. The role of metagenomics in understanding the human microbiome in health and disease. *Virulence*. 2014 Apr 1;5(3):413–23.
4. Martín R, Miquel S, Ulmer J, Langella P, Bermúdez-Humarán LG. Gut ecosystem: how microbes help us. *Benef Microbes*. 2014 Sep;5(3):219–33.
5. Miquel S, Martín R, Bridonneau C, Robert V, Sokol H, Bermúdez-Humarán LG, et al. Ecology and metabolism of the beneficial intestinal commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii*. *Gut Microbes*. 2014 Apr;5(2):146–51.

6. Miquel S, Beaumont M, Martín R, Langella P, Braesco V, Thomas M. A proposed framework for an appropriate evaluation scheme for microorganisms as novel foods with a health claim in Europe. *Microb Cell Factories*. 2015;14(1):48.
7. Martín R, Chain F, Miquel S, Motta J-P, Vergnolle N, Sokol H, *et al.* Using murine colitis models to analyze probiotics-host interactions. *FEMS Microbiol Rev*. 2017 Aug 1;41(Supp_1):S49–70.
8. Miquel S, **Lagrafeuille R**, Souweine B, Forestier C. Anti-biofilm Activity as a Health Issue. *Front Microbiol*. 2016;7:592.
9. 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 Jun;9(6):1282.

♦ *Ouvrages*

Ebook, Caister Academic Press, Edited by: Koen Venema and Ana Paula de Carmo, Pages: C.560 Probiotics and Prebiotics, Current Research and Future Trends. Chapter 12. The Indigenous Microbiota and its Potential to Exhibit Probiotic Properties. S. Miquel, R. Martin, M. Thomas, LG. Bermudez-Humaran and P. Langella. Aug. 2015.

♦ *Brevets*

Application No. : 14306803.9/ Patent No. 1401. *Faecalibacterium prausnitzii* strains for treating and preventing gastrointestinal pain.

3.2. Diffusion des travaux

♦ *Communications orales* :

Premier auteur

- S. Miquel, L. Claret, A. Darfeuille-Michaud. Régulation et rôle du système de sécrétion de type VI dans la souche de *Escherichia coli* adhérente et invasive de référence LF82 associée à la maladie de Crohn. Journées de l'Ecole Doctorale, Clermont-Ferrand France, Mai 2008.
- S. Miquel, L. Claret, A. Darfeuille-Michaud. Co-régulation entre l'expression des flagelles et des pili de type 1 chez la souche de *Escherichia coli* adhérente et invasive LF82 associée à la maladie de Crohn. Journée de la Recherche, IFR Santé Auvergne France, Novembre 2008.
- S. Miquel, S. Hudault, C. Bridonneau, S. Blugeon, LG. Bermúdez-Humarán, M.I Thomas and P. Langella. Analysis of anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii* using gnotobiotic mice. Cross Talk; University of Oslo, Norway; 12 &13 April 2012.
- S. Miquel, L. Wrzosek, ML. Noordine, S. Bouet, C. Bridonneau; C. Philippe; V. Robert; C. Cherbuy; P. Langella and M. Thomas. Acetate plays a key role in the crosstalk between

commensal bacteria and colonic epithelium for goblet cells differentiation. Symposium INRA-Rowett on Gut Microbiology, Clermont-Ferrand, France; 17-20 Juin 2012.

- S. Miquel, R Martin, F Chain, S Hudault, C Bridonneau, J Lu, J Jury, JJ Gratadou, S Blugeon, E Verdu, P Bercik, H Sokol, LG Bermúdez-Humarán, M Thomas and P Langella. Anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii* in a chemically-induced colitis model of conventional and gnotobiotic mice. Journées des microbiologistes de l'Inra, L'Isle-sur-la-Sorgue, France, 13-15 novembre 2012.

- S. Miquel, R Martin-Rosique, A Gelot, A Eschalier, D Ardid, M Thomas, P Langella, FA Carvalho. *Faecalibacterium prausnitzii* exhibits antinociceptive effect in a non-inflammatory visceral IBS-like pain model. 7th Probiotics Prebiotics New Foods, Rome, Italie, 8 10 Septembre 2013.

- S. Miquel, Beneficial bacteria as an innovative strategy to impair *Klebsiella pneumoniae* infections by modulating the gut-lung axis. The Pharmabiotics Young Investigator Awards 2018, Paris, France.

Réalisées au laboratoire d'accueil actuel avec un étudiant co-encadré :

- R. Lagrèfeuille, S. Miquel, F. Chain, P. Langella, M. Vareille et C. Forestier. Activité anti-biofilm de *Lactobacillus*. Biofilm 7, 29-28 juin 2016, Porto, Portugal.

- R. Lagrèfeuille, S. Miquel, F. Chain, P. Langella, et C. Forestier. Activité anti-biofilm de *Lactobacillus*. Colloque du réseau national Biofilms, 5-6 juin 2017, Clermont-Ferrand, France.

- T. Merciecca, S. Bornes, E. Rifa, S. Theil, O. Rendueles, E. Cascales, C. Forestier and S. Miquel. "System de secretion de type 6 chez *K. pneumoniae* : rôle dans la colonisation du microbiote intestinal. », RMPC, 8 avril 2021, Clermont-Ferrand, France.

- T. Merciecca, S. Bornes, E. Rifa, S. Theil, O. Rendueles, E. Cascales, C. Forestier and S. Miquel. "Type VI Secretion System in *K. pneumoniae* : Role in intestinal microbiota colonisation. », *Klebsiella Virtual Seminar Series 2021*, 3 juin 2021.

- T. Merciecca, L. Nakusi, S. Bornes, S. Theil, O. Rendueles, E. Cascales, C. Forestier and S. Miquel. "Type VI Secretion System in *K. pneumoniae* : Role in intestinal microbiota colonisation. », ECCMID, 23-26 avril 2022.

- M. Kaur, C. Dausset, A. Durand, A. Nivoliez, C. Forestier, S. Miquel. « Auto-aggregation and biofilm formation in Lactobacilli: two distinct lifestyles », CBL, 12-14 juin 2024, Dijon, France.

♦ *Communications affichées*

Premier auteur

- S. Miquel, L. Claret, A. Darfeuille-Michaud. Modulation of expression and role of histone-like proteins in Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82. EMBO-FEMS LEOPOLDINA SYMPOSIUM "ESCHERICHIA COLI A FACET OF A VERSATILE PATHOGEN", Wuerzburg Allemagne, Octobre 2007.
- S. Miquel, L. Claret, A. Darfeuille-Michaud. Modulation de l'expression et rôles des protéines de type-histone dans la souche de *Escherichia coli* adhérente et invasive de référence LF82 associée à la maladie de Crohn. Journée de la Recherche, IFR Santé Auvergne France, Novembre 2007.
- S. Miquel, L. Claret, N. Barnich, R. Bonnet, A. Darfeuille-Michaud. Role of histone-like protein Fis in the regulation of type 1 pili expression in Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82. Symposium on Bacterial Cell Biology and Pathogenesis and Workshop on Microscopy in Microbial System, Umeå, Suède, Juin 2009.
- S. Miquel, S. Hudault, C. Bridonneau, L. Bermúdez-Humarán, M. Thomas and P. Langella. Getting monoxenic mice with the commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* to better understand its anti-inflammatory effects. 2nd International Symposium Microbes For Health, Paris, France, Décembre 2011.
- S. Miquel, S. Hudault, C. Bridonneau, L. Bermúdez-Humarán, M. Thomas and P. Langella. Analysis of anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii* using gnotobiotic mice. International Human Microbiome Congress, MetaHIT, Paris, France, Mars 2012.
- S. Miquel, S. Hudault, C. Bridonneau, L. Bermúdez-Humarán, M. Thomas and P. Langella. Anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii* in TNBS induced colitis model of gnotobiotic mice. Digestive Disease Week, San Diego, US, Mai 2012.
- S. Miquel, S. Hudault, C. Bridonneau, S. Blugeon, LG Bermúdez-Humarán, H Sokol, M. Thomas and P. Langella. Anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii* in a TNBS induced colitis model of gnotobiotic mice. Symposium INRA-Rowett on Gut Microbiology, Clermont-Ferrand, France, 17-20 Juin 2012.
- S. Miquel, S. Hudault, C. Bridonneau, S. Blugeon, LG. Bermúdez-Humarán, H. Sokol, M. Thomas and P. Langella. Anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii* in a TNBS induced colitis model of gnotobiotic mice. Cell Symposium, Lisbonne, 12-14 Mai 2013.
- S. Miquel, R. Martin-Rosique, A. Gelot, A. Eschalier, D. Ardid, M. Thomas, P. Langella, F. A. Carvalho. The anti-inflammatory commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* also exhibit anti-nociceptive effect in a non-inflammatory visceral IBS-like pain model. UEGW, Berlin, Octobre 2013.

- S. Miquel, M. Leclerc, R. Martin, S. Hudault, C. Bridonneau, S. Raguideau, T. Northen, B. Bowen, LG. Bermúdez-Humarán, H. Sokol, M. Thomas and P. Langella. *Faecalibacterium prausnitzii* provides host beneficial metabolic profile during inflammation. Digestive Disease Week, Chicago, US, Mai 2014. Poster of Distinction.
- S. Miquel, A. Lashermes, R. Martin-Rosique, A. Gelot, A. Eschalier, D. Ardid, M. Thomas, P. Langella, F. A. Carvalho. Antinociceptive and barrier protection effects of *Faecalibacterium prausnitzii* in a non-inflammatory visceral IBS-like model. Targeting Microbiota, Paris, France, Oct. 2014.
- S. Miquel, M. Leclerc, R. Martin, S. Hudault, C. Bridonneau, S. Raguideau, T. Northen, B. Bowen, LG. Bermúdez-Humarán, H. Sokol, M. Thomas and P. Langella. Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii*. Targeting Microbiota, Paris, France, Oct. 2014.
- S. Miquel, M. Leclerc, R. Martin, F. Chain, M. Lenoir, S. Hudault, C. Bridonneau, S. Raguideau, T. Northen, B. Bowen, LG. Bermúdez-Humarán, H. Sokol, M. Thomas and P. Langella. Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii*. Keystone Symposia, Keystone, Colorado, USA, March 1-6, 2015. E-poster
- S. Miquel, L. Nakusi et C. Forestier. The organized trip of *Klebsiella pneumoniae*. FEMS 7-11 July 2019, Glasgow, Scotland.
- S. Miquel, M. Vareille-Delarbre, S. Garcin, L. Nakusi, D. Balestrino et C. Forestier. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* on inflammatory response induced by *Klebsiella pneumoniae*. SFM 30 september- 2 octobre 2019, Paris, France.
- M. Vareille-Delarbre, S. Miquel, J. Verlaguet, S. Garcin, T. Bertran, B. Evrard, C. Forestier, *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 Stimulates Epithelial Vaginal Defenses upon Gardnerella vaginalis Infection. SFM 3-5 octobre 2022, Montpellier, France

Réalisées au laboratoire d'accueil actuel avec un étudiant co-encadré :

- R. Lagrabeuille, S. Miquel, F. Chain, P. Langella, A. Nivoliez, T. Bernardi, S. Badel, L. Rios, D. Balestrino, M. Vareille et C. Forestier. Activité anti-biofilm de *Lactobacillus*. CBL 17-19 juin 2015, Lille, France.
- R. Lagrabeuille, S. Miquel, F. Chain, P. Langella, et C. Forestier. Assessing anti-biofilm activities of *Lactobacillus* strains in various experimental models. INRA-ROWETT 20-23 juin 2016, Clermont-Ferrand, France.
- M. Kaur, L. Nakusi, S. Miquel, C. Dausset, K. Roget et C. Forestier. LcR35® mechanism of action on *C. albican*. FEBS 2022, Advanced Course, 14-20 mai 2022, La colle sur loup, France.

- T. Merciecca, S. Bornes, L. Nakusi, S. Theil, O. Rendueles, C. Forestier and S. Miquel. Role of *Klebsiella pneumoniae* Type VI secretion system (T6SS) in long-term gastrointestinal colonization. SFM 3-5 octobre 2022, Montpellier, France.

Thématiques de recherche

Partie 1 Travaux antérieurs à mon intégration dans l'UMR CNRS 6023

1.1. Thèse de doctorat

Dates : 2006/2010

Directeur : Dr. Claret Laurent

Titre : Facteurs de virulence de *Escherichia coli* adhérents et invasifs associés à la maladie de Crohn : caractérisation et régulation de leur expression.

Lieu : Pathogénie Bactérienne Intestinale, USC INRA-2018, JE2526, Université d'Auvergne, dirigée par le Pr. Arlette Darfeuille-Michaud.

Financement : Allocation de recherche MENRT.

Mots clés : Maladie de Crohn, Adherent-Invasive *Escherichia coli* (AIEC), microbiologie cellulaire, régulation de facteurs de virulence, analyse génomique.

Valorisation : 3 articles et 7 actes de congrès

Contexte scientifique : La maladie de Crohn (MC) est une affection inflammatoire chronique du tube digestif touchant avec prédilection l'adulte jeune et caractérisée par un état d'hyperactivation du système immunitaire. De nombreux arguments épidémiologiques, cliniques et expérimentaux laissent suspecter une origine infectieuse. En effet, une colonisation anormale de la muqueuse iléale des patients atteints de MC par *Escherichia coli* a été observée. Les souches de *E. coli* incriminées ont la capacité d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales, de survivre et se multiplier en macrophages. Elles sont dénommées AIEC pour « adherent-invasive *E. coli* ». La prévalence des AIEC au niveau iléal est de 36,4% chez les patients atteints de MC et de seulement 6,2% chez les sujets non atteints de pathologie inflammatoire intestinale (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004).

Travaux personnels : L'ensemble de mes travaux de thèse avait pour objectif de mieux comprendre les mécanismes de virulence des souches AIEC. Pour cela, j'ai étudié la régulation de l'expression de facteurs de pathogénicité en modèle cellulaire mimant le contexte intestinal et j'ai participé à l'annotation du génome de la souche AIEC LF82, référence du pathovar, et évalué sa pathogénicité en modèle murin.

a. Etude de la régulation de l'expression de facteurs de pathogénicité

Les facteurs de pathogénicité majeurs des AIEC sont les flagelles et les pili de type 1 ; Il avait été montré préalablement que leur expression était coordonnée : un mutant de la souche AIEC LF82 n'exprimant plus de flagelles perd, de façon concomitante, sa capacité à synthétiser des pili de type 1, adhésine majeure (Barnich *et al.*, 2003). Afin d'identifier les régulations croisées entre les gènes codant ces différentes structures de surface, des mutants isogéniques ou d'insertion dans des gènes codant différents régulateurs transcriptionnels ont été créés et analysés.

Une première étude a ciblé les régulateurs du régulon flagellaire *flhD* et *fliA*. L'analyse phénotypique de mutants isogéniques a ainsi montré que la co-régulation complexe flagelles/pili de type 1 dépendait du taux intracellulaire du messager di-GMP cyclique (Claret *et al.*, 2007) (**Figure 1**). Cette étude, novatrice en 2007, a permis de mieux comprendre le rôle majeur du second messager qu'est le di-GMPc dans l'expression de la virulence.

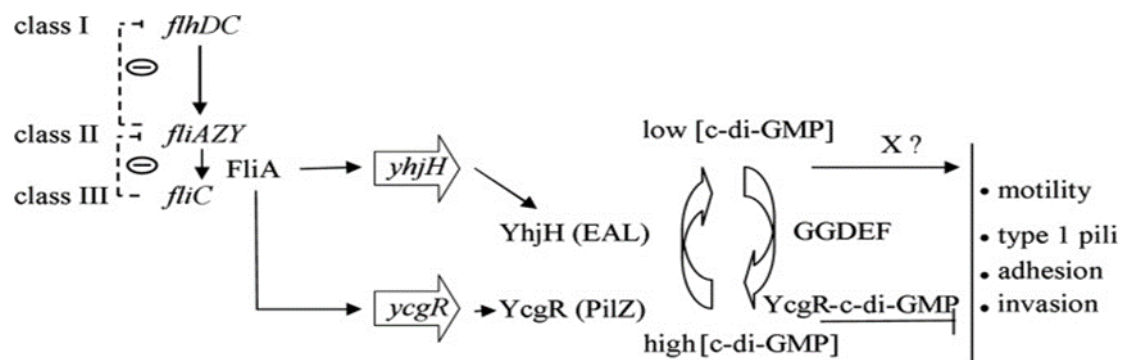


Figure 1. Modèle de régulation coordonnée de la synthèse de flagelles et des pili de type 1 dépendante du c-di-GMP. Lorsque la cascade du régulon flagellaire est activée, l'accumulation du facteur sigma FliA entraîne une forte induction concomitante des gènes *yhjH* et *ycgR*. Le domaine EAL de la phosphodiesterase YhjH dégrade le c-di-GMP pour abaisser sa concentration locale et supprimer l'activité d'un complexe putatif YcgR-c-di-GMP, conduisant finalement à l'activation synchronisée de divers facteurs d'adhésion et d'invasion de la souche AIEC LF82 et notamment l'activation des gènes permettant la synthèse des pili de type 1 (Claret *et al.*, 2007).

La seconde étude a permis de mettre en évidence le rôle de régulateurs globaux que sont les protéines de type histone dans la régulation de la virulence de la souche AIEC LF82. Parmi les cinq protéines de type-histone (H-NS, HU, Lrp, IHF et Fis), seule l'expression du gène codant Fis est diminuée lors du contact de la souche AIEC LF82 avec des cellules épithéliales intestinales en culture (I-407). Dans cette condition particulière, mimant un contexte intestinal, la diminution de la concentration en protéine Fis entraîne un défaut d'expression de la recombinase FimE, et donc une inversion du promoteur de l'opéron *fim* de la phase ON vers la phase OFF, ce qui conduit à une surexpression des pili de type 1 et à un découplage la co-régulation flagelles/pili de type 1 (Miquel *et al.*, 2010a) (**Figure 2**).

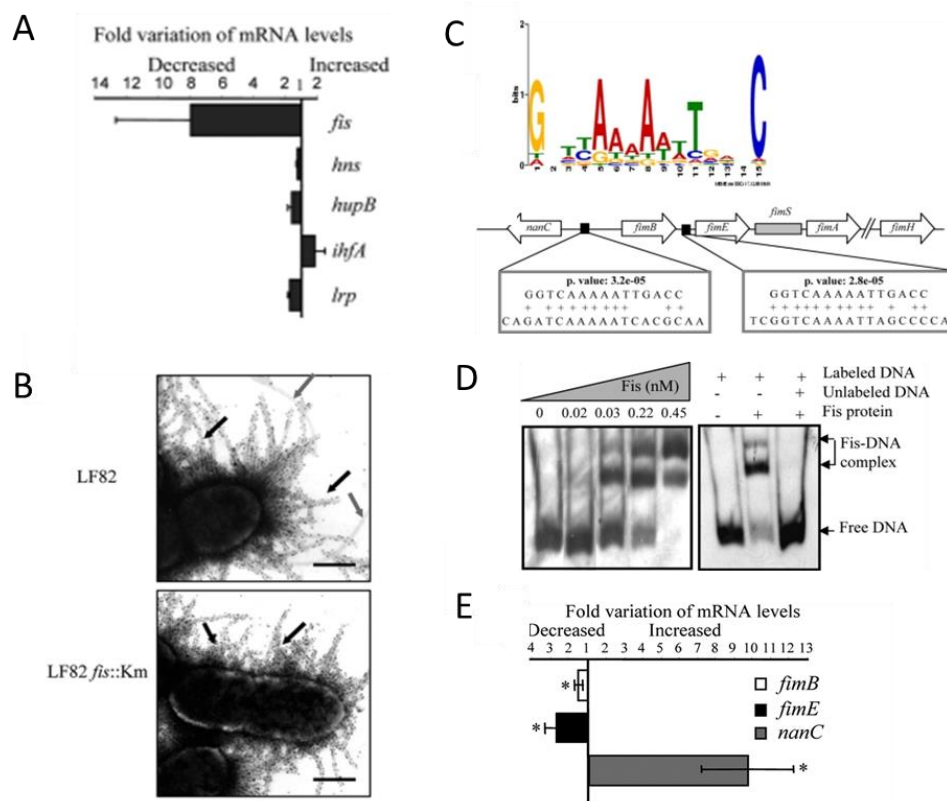


Figure 2. Couplage de la co-régulation flagelles/pili de type 1 par la protéine de type histone Fis. **A.** Niveaux d'ARNm des gènes *fis*, *hns*, *hupB*, *ihfA* et *lrp* dans les bactéries AIEC LF82 après 3 heures de contact avec les cellules intestinales 407 par rapport aux niveaux observés dans les bactéries cultivées 3 h en MEM. Comme témoins, les niveaux d'ARNr 16S ont été mesurés. **B.** Microscopie électronique à transmission (MET) après immuno-marquage avec des billes d'or des pili de type 1 (flèche noire). Les flagelles (flèche grise) ne sont observés qu'à la surface des bactéries de la souche sauvage. La barre d'échelle noire représente 500 nm. **C.** Identification des sites de fixation spécifiques à Fis dans l'opéron *fim*. **D.** Validation de ces sites de fixation par gel retard. **E.** Variation des niveaux d'ARNm de *nanC*, *fimB* et *fimE* dans le mutant LF82 *fis*::Km par rapport à ceux de la souche sauvage LF82. D'après Miquel *et al.*, 2010.

La publication issue de ces résultats a constitué le travail majeur de ma thèse. Elle reflète ma première expérience de jeune chercheur et a permis de mieux comprendre comment cette bactérie adapte l'expression de ses facteurs de pathogénicité au contact des cellules épithéliales intestinales. Suite à ce travail, il a été mis en évidence qu'un mutant (LF82- Δ *flgM*) sécrétant continuellement la protéine majeure des flagelles, la flagelline, déclenche une réponse inflammatoire plus forte que la souche sauvage, avec une capacité moindre à coloniser le tube digestif de souris CEABAC10 (Sevrin *et al.*, 2020). Ainsi, via le régulateur Fis, la souche AIEC LF82 stimule sélectivement l'expression des pili de type 1, sans modifier celle des flagelles, ce qui permet de maintenir une adhésion bactérienne aux cellules via le récepteur spécifique CEACAM6, tout en limitant la réponse inflammatoire qui serait délétère pour la bactérie.

Plus globalement, ces travaux mettent en évidence une expression maximale des pili de type 1 via différents systèmes de régulation transcriptionnelle, qui confère aux AIEC un avantage par rapport aux bactéries du microbiote intestinal. Ce travail de recherche fondamentale a ainsi permis de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement la prévention du pouvoir pathogène des AIEC. Des travaux dans ce sens ont ensuite été conduits et ont permis de développer des antagonistes de la protéine d'adhésion FimH dérivés du mannose, candidats à de futurs essais cliniques (Sivignon *et al.*, 2017).

b. Séquence et analyse du génome de la souche de *E. coli* adhérente et invasive isolée de patient atteint de maladie de Crohn.

Le séquençage complet du génome de la souche AIEC LF82 a été réalisé au Génoscope. L'annotation et l'analyse du génome de la souche de référence AIEC LF82 avait pour but de mieux comprendre son potentiel de virulence. Mon travail a porté sur l'analyse des données, notamment en faisant une annotation fine et en comparant les génomes des *E. coli* disponibles dans les bases de données. En 2010, cette approche n'était pas automatisée et les données générées ont permis de mieux comprendre l'évolution phylogénique de l'espèce *E. coli*. Ce travail a confirmé, par de multiples approches (MLST, identification de CRISPR, comparaisons génétiques), l'appartenance de la souche AIEC LF82 au groupe B2 regroupant la plupart des *E. coli* pathogènes (Miquel *et al.*, 2010b) (**Figure 3**).

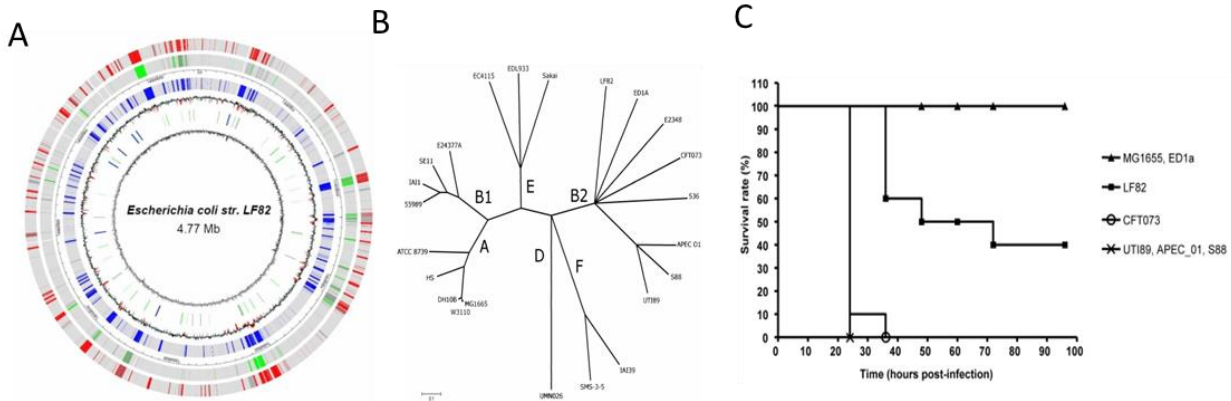


Figure 3. Caractérisation génomique et de la virulence de la souche de référence AIEC LF82. **A.** Représentation circulaire du génome de la bactérie *E. coli* LF82. Cercles de l'intérieur vers l'extérieur : (1) Inclinaison du CG, (2) Emplacement des ARNt (vert), des ARNr (bleu) et des séquences d'insertion (gris). (3) Teneur moyenne en GC– GC moyenne globale. Les zones rouges indiquent que l'écart est supérieur à 2 (4) (5) et (6) Spécificité génétique de la souche LF82 au niveau de la souche (K12, en bleu) et au niveau du groupe : souches *E. coli* B2, en vert, et souches commensales *E. coli*, en rouge. Les gènes partageant au moins un homologue dans le génome d'un autre *E. coli* du même groupe et ayant plus de 85 pour cent d'identité sur au moins 80 pour cent de sa longueur ont été considérés comme non spécifiques. **B.** Analyse phylogénétique basée sur la séquence de 7 gènes (*arcA*, *aroE*, *icd*, *mdh*, *mtlD*, *pgi* et *rpoS*) de 23 souches de référence dont LF82. Les branches principales sont étiquetées selon les phylogroupes majeurs A, B1, B2, D, E et F. **C.** Évolution du taux de survie des souris infectées par voie sous-cutanée avec diverses souches d'*E. coli*. Un inoculum de 2×10^8 bactéries a été administré à des souris OF1 (N=10). Les souches ont été classées comme non tueuses (<2 souris tuées sur 10), tueuses (>8 souris tuées) ou intermédiaires. D'après Miquel *et al.*, 2010.

La publication issue de ces travaux présente la première séquence complète d'une souche AIEC, référence du pathovar. Elle a permis de mettre en évidence la présence d'éléments génétiques inconstants, notamment des îlots de pathogénicité codant la mise en place de systèmes de sécrétion de type VI (SST6). Ces complexes multiprotéiques des bacilles à Gram négatif ont été décrits comme étant impliqués à la fois dans la compétition bactéricide (Journet and Cascales, 2016) et dans l'interaction avec les cellules eucaryotes (Hachani *et al.*, 2016). Ils agissent comme des arbalètes en injectant des protéines toxiques (effecteurs) dans les cellules adjacentes, ce qui confère aux bactéries qui les expriment un avantage sélectif au sein de communautés complexes telles que le microbiote intestinal (Chassaing and Cascales, 2018; Merciecca *et al.*, 2022). Chez les AIEC, ces systèmes, activés spécifiquement en présence de sels biliaries, contribueraient à la colonisation intestinale. L'étude de ces facteurs est toujours en cours au laboratoire M2iSH et je participe à la réflexion sur les résultats obtenus (cf.

Communications affichées et Comité de suivi de thèse d'Hélène Botchorichvili, Laboratoire M2iSH). De plus, des mutations ponctuelles ont été retrouvées dans le génome de la souche AIEC LF82, de type pathoadaptatives, dans des gènes de virulence connus et notamment fimH codant l'adhésine des pili de type 1. Ces mutations, spécifiques aux AIEC, ont fait l'objet de travaux ultérieurs qui ont mis en évidence la capacité accrue de cette adhésine mutée à adhérer au récepteur CEACAM des cellules épithéliales intestinales et à induire une inflammation intestinale en modèle murin (Dreux *et al.*, 2013).

L'analyse du génome a également permis de confirmer le potentiel virulent de la souche AIEC LF82, ce qui a été confirmé par un test de létalité en modèle animal souris (mesure de la dose létale 50 après injection intra-abdominale). Le phénotype observé est intermédiaire par rapport aux souches considérées comme « tueuses » (APEC-01, S88, UTI89 et CFT076) et aux souches « non tueuses » (K-12 MG1655 et ED1a). Nous avons ainsi proposé que la souche AIEC LF82 pouvait être assimilée à un pathogène opportuniste (Miquel *et al.*, 2010a). Ce travail a donné lieu à une publication dans la revue PlosOne où j'apparais en tant que premier co-auteur.

1.2. Recherches post-doctorales

Dates : 2011/2013

Directeurs : Dr. Philippe Langella et Dr. Muriel Thomas

Titre du projet : PROJET FPARIS : Nouvelle génération de compléments alimentaires à effet positif prouvé sur le SII (syndrome de l'intestin irritable) chez l'homme.

Lieu : INRA de Jouy-en-Josas, Unité MICALIS, au sein de l'équipe « Interactions des bactéries commensales et probiotiques avec l'hôte » dirigée par le Dr. Philippe Langella.

Contexte collaboratif et Financement : Projet de R&D collaboratif (trois autres partenaires, dont deux sociétés privées), Pôle de compétitivité Vitagora. Le financeur du projet est le FUI : Fonds Unique Interministériel, Direction Générale de la Compétitivité, de l'Industrie et des Services.

Mots clés : Culture anaérobie, *Faecalibacterium*, Epithélium intestinal, Gnotoxénie, Syndrome de l'intestin irritable, Microbiote.

Valorisation : 7 articles, 1 brevet, 6 revues, 1 chapitre de livre et 28 actes de congrès.

Contexte scientifique : Les maladies intestinales (Maladie Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), Syndrome de l'Intestin Irritable (SII)...), se caractérisent par une dysbiose du microbiote intestinal des patients. Nous avons précédemment vu que certaines bactéries opportunistes pouvaient s'installer, et ce au dépend d'autres bactéries commensales. Une étude précédente de l'équipe avait montré que la bactérie commensale *Faecalibacterium* présentait des propriétés anti-inflammatoires, ce qui en faisait un très bon candidat pour le développement d'un Produit Bio-thérapeutique vivant (PBV) (Sokol *et al.*, 2008).

Travaux personnels : Ma contribution à ce projet a eu lieu en plusieurs étapes successives, allant de l'isolement de souches commensales de *Faecalibacterium* à la caractérisation de leurs effets fonctionnels dans des modèles de SII. En parallèle, j'ai développé des approches plus fondamentales pour comprendre les mécanismes d'actions des propriétés bénéfiques sur l'hôte de la souche de référence *F. prausnitzii* A2-165, reclassée *F. dunclaniae* (Sakamoto *et al.*, 2022). L'ensemble de ces données a été nécessaire pour établir la preuve de concept au développement de nouveaux produits innovants, à base de microorganismes vivants.

a. Projet collaboratif FParis

L'objectif scientifique global du consortium était la conception d'un nouveau complément alimentaire comprenant une bactérie anaérobie stricte commensale issue du microbiote humain. Ce complément était destiné aux patients souffrant du SII mais les données aujourd'hui disponibles sur le sujet ont permis d'élargir son potentiel d'utilisation. Les objectifs de l'équipe du Dr. P. Langella dans ce consortium étaient :

- 1) d'isoler et de caractériser de nouvelles souches humaines du genre *Faecalibacterium*
- 2) d'établir les effets « santé » de ces souches dans des modèles animaux.

L'isolement de nouvelles souches de *Faecalibacterium* a été réalisé au laboratoire à partir de selles de personnes saines dans des conditions anaérobies strictes, étant donné l'extrême sensibilité de cette espèce à l'oxygène. Ce travail fastidieux d'isolement mais aussi de caractérisations phénotypiques (microscopie à balayage), génétiques (séquençage 16S), métaboliques (production d'acides gras à chaînes courtes, galeries d'identification) et fonctionnelles (activité anti-inflammatoire *in vitro*, adhésion, résistance aux antibiotiques) est

le fruit d'un travail d'équipe, avec deux techniciennes et une autre post-doctorante impliquée dans le projet (Dr. Rebeca Martin) (Martín *et al.*, 2017b) (**Figure 4A**).

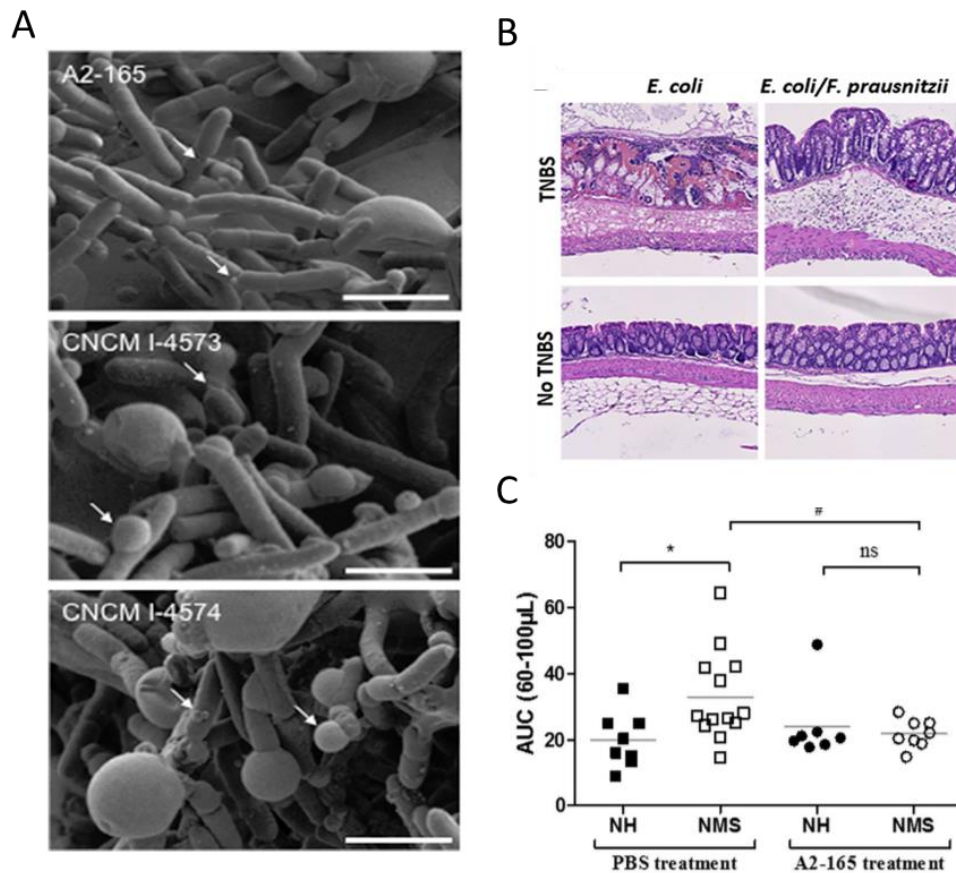


Figure 4. *Faecalibacterium*, des souches aux capacités anti-inflammatoires et anti-nociceptives. **A.** Microscopie électronique à balayage de différentes souches de *Faecalibacterium* isolées de selles de donneurs sains. **B.** Images représentatives de coupes histologiques après coloration de l'hématoxyline-éosine-safran provenant de côlons de souris *E. coli*-monoassociées et *E. coli/F. duncaniae*-di-associées, avec ou sans colite. **C.** Effet de *F. duncaniae* A2-165 sur l'hypersensibilité viscérale dans le modèle d'hypersensibilité colique après séparation maternelle (NMS). La réponse viscéromotrice à la distension colorectale chez les souris témoins non-sensibilisées (NH) et hypersensibilisées (NMS) (n = 8 et n = 13 respectivement) et chez les souris traitées avec *F. duncaniae* (n = 7 et n = 8 respectivement). L'aire sous la courbe (ASC) a été calculée entre 60 μ L et 100 μ L de volume inoculé pour la distension pour les différents groupes de souris. D'après Martín *et al.*, 2017, Miquel *et al.*, 2015 et Miquel *et al.*, 2016.

Dix nouvelles souches de *Faecalibacterium* ont ainsi été isolées et leur génome séquencé (Benevides *et al.*, 2017). Trois souches ont été retenues en fonction de i) leur capacité anti-inflammatoire in vitro, ii) leur taux de croissance iii) leur résistance limitée à quelques antibiotiques et leur capacité à produire du butyrate. Elles ont été testées dans un modèle murin d'hypersensibilité viscérale induite par séparation maternelle permettant de reproduire des

symptômes caractéristiques du SII. Ces expérimentations ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire NeuroDol (Unité Inserm 1107/Université d'Auvergne). Pour la première fois, il a été ainsi mis en évidence que des bactéries commensales avec des propriétés anti-inflammatoires (Martín *et al.*, 2014a; Miquel *et al.*, 2015b), possédaient aussi des propriétés anti-nociceptives spécifiques (Miquel *et al.*, 2016b) (**Figure 4BC**). Dans des modèles d'inflammation chronique à bas bruit, ces souches sont capables à la fois de limiter la perméabilité intestinale mais aussi l'inflammation tissulaire et la production de sérotonine (Martín *et al.*, 2015). L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'un **brevet Européen** (Patent No. 14306803.9-1401) intitulé : « *Faecalibacterium prausnitzii* strains for treating and preventing gastrointestinal pain ».

Au cours de mon séjour postdoctoral, j'ai également participé à l'argumentaire scientifique pour la production de PBV et aux réflexions sur les contraintes de production d'une bactérie anaérobie stricte à l'échelle industrielle, un verrou scientifique majeur en 2012. J'ai d'abord effectué un travail de synthèse bibliographique conduisant à la publication de plusieurs revues, dont trois où j'apparais en premier auteur. Deux d'entre elles sont focalisées sur *F. duncaniae* A2-165 : ses « effets santé » et son métabolisme (Miquel *et al.*, 2013, 2014). La troisième est un point de vue concernant la réglementation relative à l'innocuité des microorganismes et à leurs allégations (Miquel *et al.*, 2015a). J'ai aussi participé à la rédaction d'un chapitre de livre sur les probiotiques et les prébiotiques et à quatre autres revues (Martín *et al.*, 2013, 2014d, 2014c, 2017a).

Certaines souches isolées et caractérisées lors de ce travail sont actuellement testées chez l'homme (essai clinique Phase 1) par la compagnie **exliom Biosciences**.

b. Etude des mécanismes d'action impliqués dans les effets santé bénéfiques de *Faecalibacterium*

Le microbiote des patients atteints de MC comporte un déficit marqué du groupe bactérien *Clostridium leptum*, et notamment son représentant majeur, *Faecalibacterium*. Chez ces patients, la dysbiose s'accompagne d'une augmentation des bactéries appartenant au phylum *Bacteroides* (dont *Bacteroides thetaiotaomicron* est un des représentants majeurs) et de *E. coli* (Manichanh *et al.*, 2006). En parallèle de l'isolement de nouvelles souches de *Faecalibacterium*, j'ai étudié les propriétés fonctionnelles et les mécanismes d'action

permettant à ces bactéries de participer à l'homéostasie de l'épithélium et de le protéger lors d'une inflammation. Les études *in vitro* s'avérant délicates, du fait de l'extrême sensibilité de *Faecalibacterium* à l'oxygène, j'ai développé des modèles gnotobiotiques (rongeurs à flore contrôlée), qui se sont révélés être une approche pertinente pour lever des verrous technologiques.

♦ *Faecalibacterium participe à l'homéostasie de l'épithélium colique*

Une première étude a permis de mettre en évidence l'importance d'un équilibre entre deux bactéries commensales dominantes, *B. thetaiotaomicron* (phyla des Bacteroidetes) et *F. duncaniae* (Firmicutes) dans la modulation de la différenciation des cellules à mucus, éléments clés du maintien de l'homéostasie intestinale. Pour cela, j'ai mis au point des modèles de rats gnotobiotiques avec la souche *F. duncaniae* A2-165, afin d'étudier la réponse de l'hôte au niveau colique par des techniques d'histologie (colorations, immuno-marquages), Western-blot, q-PCR et analyse de la glycosylation des mucines (**Figure 5**). Par ailleurs, nous avons montré, dans un modèle de rats monoxéniques que *B. thetaiotaomicron* produit de l'acétate et module la différenciation des cellules à mucus au dépend des cellules entéroendocrines. Ceci s'accompagne de la modification du profil de glycosylation des mucines avec une diminution des chaînes glycosylées neutres et sulfatées au profit des chaînes glycosylées sialylées. La présence de *F. duncaniae* combinée à celle de *B. thetaiotaomicron* (rats dixéniques) atténue ces effets. De plus, *F. duncaniae* induit la production de butyrate à partir de l'acétate issu du métabolisme de *B. thetaiotaomicron*. Des expériences réalisées *in vitro* avec la lignée de cellules productrices de mucus (HT-29 MTX) ont ensuite montré que l'acétate induit la modulation du facteur de transcription KLF4 impliqué dans la différenciation des cellules à mucus. Ainsi, *F. duncaniae* atténue l'effet inducteur *B. thetaiotaomicron* sur la différenciation des cellules à mucus via leurs complémentarités métaboliques. Ces données ont initié l'étude des interactions hôte-bactéries en soulignant le fait que *F. duncaniae* contribue à l'équilibre de l'épithélium intestinal en maintenant l'homéostasie cellulaire (**Figure 5**) (Wrzosek *et al.*, 2013). L'analyse transcriptomique de la souche *F. duncaniae* A2-165 a depuis été réalisée et a confirmé l'importance de l'acétate dans la régulation de l'expression de *feoB*, codant un transporteur de fer ferreux (FeoB) présent au niveau fécal seulement chez les personnes saines (Verstraeten *et al.*, 2024).

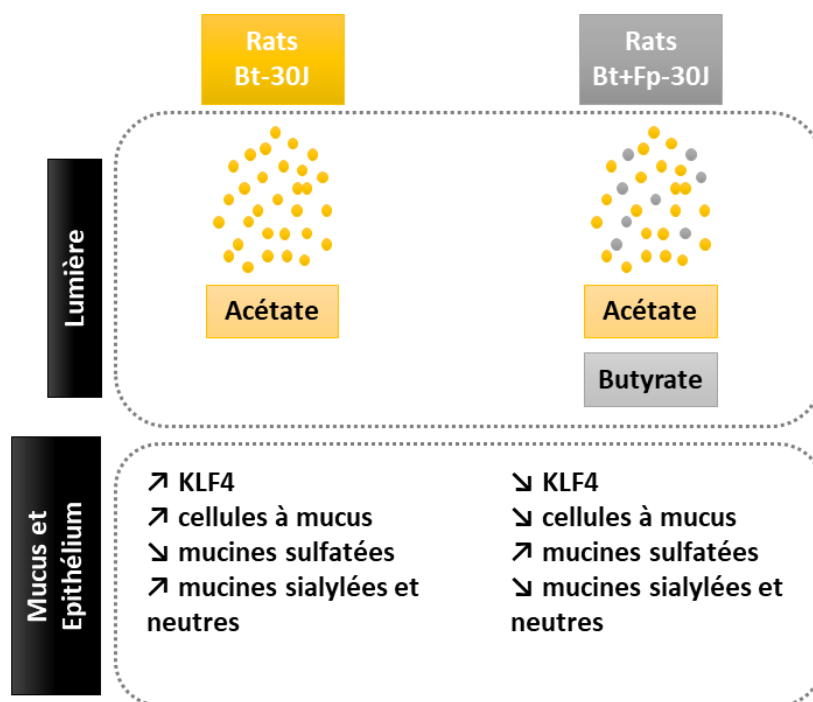


Figure 5. Etude du rôle des bactéries commensales en modèle gnotobiotique sur l'homéostasie intestinale vis-à-vis de la production de mucus. Bt-30J: rats monoxéniques colonisés par *B. thetaiotaomicron* pendant 30 jours; bt+Fp-30J: rats dixéniques colonisés par *B. thetaiotaomicron* et *F. duncaniae* pendant 30 jours. KLF4: Kruppel-like factor 4, facteur de transcription impliqué dans la différenciation des cellules à mucus. D'après Wrzosek *et al.*, 2013

♦ *Faecalibacterium protecteur de l'épithélium colique lors d'une colite induite chimiquement*

Les modèles d'animaux gnotobiotiques hébergeant *F. duncaniae* dans leur tractus intestinal sont des outils intéressants pour comprendre les mécanismes anti-inflammatoires de cette bactérie (Miquel *et al.*, 2015b). Cependant, *F. duncaniae* est une bactérie qui colonise très difficilement le tractus digestif de souris axéniques, c'est pourquoi j'ai utilisé une souche de *E. coli* commensale comme "compagnon" afin de préparer le tractus digestif à l'implantation de *F. duncaniae*. L'induction d'une colite chimique au TNBS (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid) a ainsi été réalisée chez ces animaux au microbiote simplifié (*E. coli*/*F. duncaniae*) en parallèle de groupes contrôles. L'analyse de différents paramètres (sévérité de la maladie, réponse inflammatoire, scores histologiques et macroscopiques), associés à des numérations bactériennes a confirmé le rôle protecteur de *F. duncaniae* vis-à-vis de la colite induite. Une approche métabolomique des fèces, du contenu intestinal et du sérum des animaux gnotobiotiques, en collaboration avec le « Lawrence Berkeley National Laboratory » (Berkeley, California, USA), a permis d'identifier une signature métabolique spécifiquement associée à la

présence de *F. duncaniae*. Parmi 983 métabolites identifiés, 279 étaient associés à des réactions chimiques connues, dont certaines voies métaboliques importantes impliquant l'alpha-cétoglutarate, le raffinose ou encore les acides shikimique et salicylique (**Figure 6A**). Une approche *in vitro* sur cellules en culture a confirmé l'implication fonctionnelle de ce dernier acide dans l'effet anti-inflammatoire de *F. duncaniae* (**Figure 6B**).

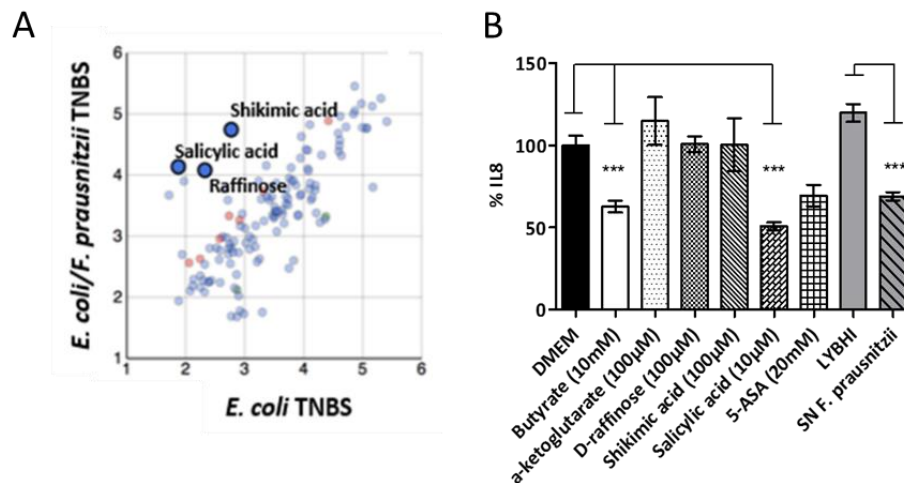


Figure 6. Approche métabolomique pour la caractérisation des capacités anti-inflammatoires de la souche de référence *F. duncaniae* A2-165. **A.** Métabolites sériques de souris monocolonisées par *E. coli* (n = 8) comparés des souris colonisées par *E. coli* et *F. duncaniae* (n = 10) après traitement TNBS. **B.** Capacités d'immunomodulation du surnageant de *F. duncaniae* et des molécules identifiées *in vitro*. La production d'IL-8 est induite dans les cellules HT-29 stimulation au TNF- α . Les résultats sont exprimés en picogrammes d'IL-8 par milligramme de protéine et ont été normalisés avec l'IL-8 produit après la coincubation avec le milieu de PBS ou de LYBHI. SN, surnageant de *F. duncaniae* (20 %). ***, p=0,001. D'après Miquel *et al.*, 2015b.

J'ai aussi participé à une approche originale pour identifier les molécules actives présentes dans le surnageant de culture de *F. duncaniae* : la recherche de peptides par spectrométrie de masse. Cette étude a permis d'identifier une protéine de 15kDa, nommée MAM (microbial anti-inflammatory molecule), capable d'inhiber l'activation de la voie NF- κ B dans des cellules épithéliales intestinales en culture et de diminuer les signes clinique d'une colite induite en modèle murin (Quévrain *et al.*, 2016; Breyner *et al.*, 2017). L'étude de protéines MAM de différents isolats et de leurs gènes de structure a permis de fournir des preuves de leur diversité fonctionnelle, une étape indispensable au choix des souches à potentiel thérapeutique (Auger *et al.*, 2022). Par ailleurs, une étude transcriptomique de la réponse de

l'hôte (cellules intestinales en culture HT-29) a depuis montré que le butyrate produit par *F. duncaniae* augmente l'expression de *Dact3*, un gène lié à la voie Wnt/JNK (Lenoir *et al.*, n.d.).

Au cours de mon post-doctorat, j'ai initié deux collaborations qui m'ont permis d'apprendre de nouvelles techniques (étude de l'hypersensibilité viscérale et métabolomique), mais aussi d'acquérir une nouvelle expérience professionnelle à l'étranger (2 mois à Berkeley, USA). De plus, j'ai aussi apporté de nouvelles compétences techniques au laboratoire qui m'ont permis d'être associée à des publications en marge de mon sujet (Martín *et al.*, 2014b; Aranias *et al.*, 2015; Laval *et al.*, 2015).

Partie 2 Travaux réalisés depuis mon intégration dans l'UMR 6023

Dates : 2014 - 2024

Directeur : Pr. Christiane Forestier

Lieu : Université d'Auvergne, UMR CNRS 6023, Laboratoire Microbiologie Génome et Environnement, au sein de l'équipe « Communautés Microbiennes Ecotoxicologie et Santé (CMES) »

Contexte : **2014-2015** : Poste d'Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche puis **2014-2024** : Maître de Conférences des Universités (CNU 87)

Valorisation : 7 articles, 2 revues, et 14 actes de congrès.

Travaux personnels : Mon parcours scientifique illustre l'intérêt que je porte aux questions concernant les relations entre les micro-organismes, leur hôte et leur environnement. D'une relation hôte-pathogène, étudiée pendant ma thèse, à l'analyse des bactéries commensales et probiotiques lors de mon post-doctorat, j'avais acquis tous les éléments pour développer un sujet de recherche au sein de la problématique de mon équipe d'accueil appliquée au microbiote intestinal. Au cours des 10 dernières années, j'ai ainsi eu pour objectif de comprendre les processus de colonisation intestinale par le pathogène *K. pneumoniae* et la virulence associée. Je me suis également impliquée dans l'étude et le mécanisme d'action de bactéries bénéfiques, et notamment les mécanismes d'action d'une bactérie dont les effets sont reconnus depuis plus de 70 ans « *Lactocaseibacillus rhamnosus* Lcr35 » et ce en collaboration avec les entreprises Biose Industrie et NexBiome Therapeutics.

Mots clés : *Klebsiella pneumoniae*, biofilm, Lactobacilles, modèles de colonisation intestinale

2.1. Modes d'action de bactéries bénéfiques

a. Effet de la souche *Lactocaseibacillus rhamnosus* Lcr35

La société Biose et aujourd'hui NexBiome Therapeutics commercialisent depuis plus de 60 ans des produits pharmaceutiques à base du probiotique vivant *Lactocaseibacillus rhamnosus* Lcr35 dont certains bénéficient d'une autorisation de mise sur le marché (AMM). Des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence les capacités d'adhésion de ce probiotique aux cellules

vaginales et l'impact négatif de cette bactérie sur la croissance de pathogènes (*Candida* et *Gardnerella vaginalis*) (Coudeyras *et al.*, 2008). Des formulations vaginales de ce Lactobacille sont d'ores et déjà sur le marché avec notamment une formulation originale (Brevet N° 16/51717 mars 2016) pour le traitement en première intention des candidoses vaginales en lieu et place des agents antifongiques chimiques. Les données scientifiques permettant d'expliquer le mécanisme d'action du probiotique Lcr35 dans le traitement des candidoses vaginales ont été des éléments clés de l'argumentaire pour la réalisation des études cliniques en cours.

Il a été montré que la formulation du produit et notamment la présence de sel de thiosulfate (STS), utilisé pour augmenter la viabilité des bactéries au cours des opérations de production, optimise l'effet anti-*Candida* du Lcr35 (Nivoliez *et al.*, 2012, 2015). Ce phénomène indépendant du contact direct levure / bactérie induit l'élimination totale du champignon en 48h (**Figure 7A**). Des approches très originales (expériences sensorielles non verbales et volatolomique), en collaboration avec l'INRAE, équipe MASS, ont permis l'identification de composés odorants, dont un composé soufré identifié comme S-méthylthioacétate (MTA). Le MTA a été associé à l'effet antifongique de Lcr35 et son lien fonctionnel a été établi *in vitro* (Dausset *et al.*, 2020) (**Figure 7B**). Ce travail a été poursuivi dans le cadre du projet consortium européen FunHoMic (Fungus Host Microbiota Innovative Training Network). Nous avons ainsi récemment identifié le mécanisme antifongique de la souche Lcr35 potentialisé par le STS (Kaur *et al.*, 2023) : la bactérie Lcr35 produit de l'acide lactique et acétique qui décomposent le STS en soufre élémentaire, entraînant un puissant effet fongicide (**Figure 7C**).

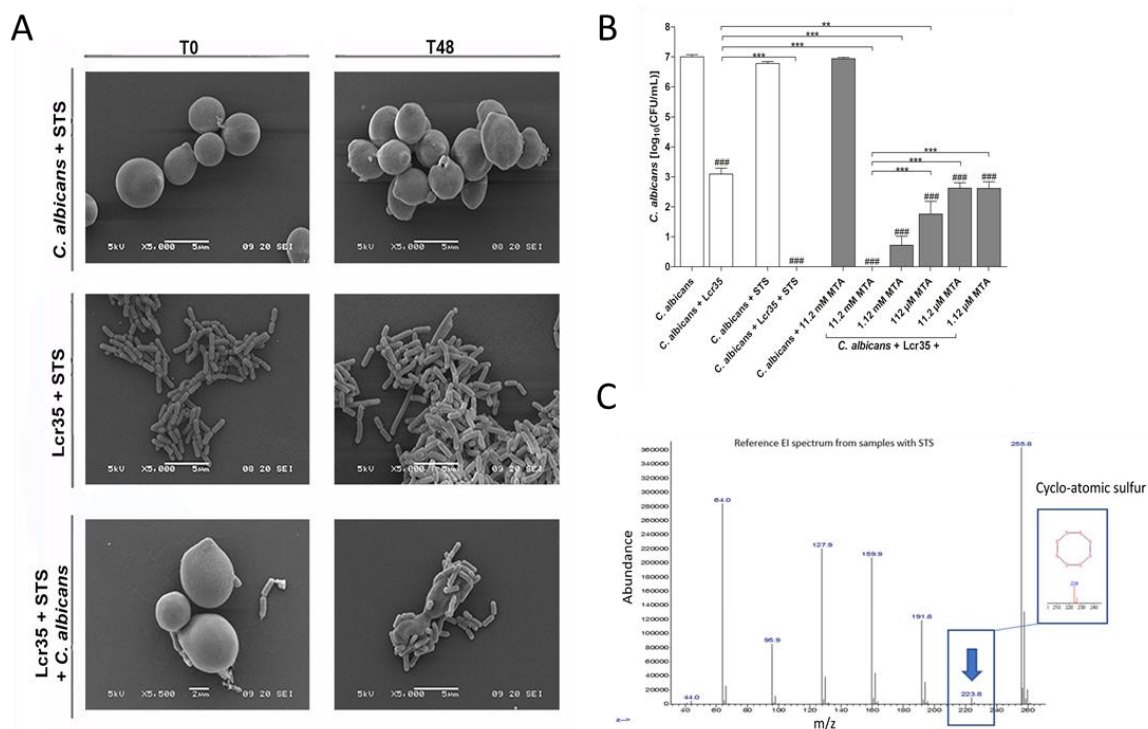


Figure 7. Mécanismes d'action antifongique de la souche probiotique *L. rhamnosus* Lcr35.

A. Microscopie électronique à balayage de *Candida* ATCC 10231 et/ou Lcr35 à T0 et après 48h (T48) de (co)-incubation en présence de Sodium Thiosulfate (STS). **B.** Effet anti-*Candida* de Lcr35 potentialisé en présence de STS et S-méthylthioacétate (MTA). Viabilité de *C. albicans* déterminée après 24h de co-incubation avec Lcr35 (barre blanche), +/- STS (1 g/l) (barre blanche) et +/- une dose croissante de MTA (barre grise). Témoin, *C. albicans* incubé dans MRS, MRS + 1 g/l STS et MRS + 11,2 mM MTA. N = 3, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, différence significative entre la condition et son contrôle ####p < 0,001 (test ANOVA unidirectionnel et correction de Bonferroni). **C.** Spectre de masse de la fraction de surnageant présentant l'activité anti-*Candida* (pic élué à 58 min par C18-HPLC puis purifié sur colonne de silice) et identification du cyclo-octasulfur isolé du milieu contenant du STS. D'après Dausset *et al.*, 2020 et Kaur *et al.*, 2023.

Par ailleurs, Lcr35 présente aussi des effets anti-pathogène vis-à-vis de la bactérie *G. vaginalis*, responsable de vaginoses (Coudeyras *et al.*, 2008). Nous avons étudié ses effets sur les réponses immunitaires épithéliales vaginales et dendritiques (DC) générés par une infection à *G. vaginalis* (Miquel *et al.*, 2022). La présence de Lcr35 augmente significativement la production des cytokines pro-inflammatoires IL-8 et IL-1b et de la β -défense humaine 2 (HBD-2) mais diminue celle de SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor) dans les cellules épithéliales vaginales infectées par *G. vaginalis*. Ainsi la modulation de la réponse immunitaire

et notamment l'inhibition de la synthèse de SLPI par Lcr35 dans les cellules épithéliales vaginales contribuent à la réponse de défense de l'hôte contre l'infection à *G. vaginalis*.

b. Etude des modes de vie de souches de Lactobacilles d'intérêt

Les bactéries lactiques sont les bactéries dominantes du tractus vaginal chez les femmes en bonne santé et forment une population barrière qui protège contre la colonisation des agents pathogènes par des mécanismes décrits ci-dessus (activités métaboliques, interactions avec le système immunitaire) mais aussi via leur capacité d'adhérer aux surfaces épithéliales, l'auto-agrégation et la co-agrégation des pathogènes. Le mode de vie des bactéries (planctonique, biofilm) influence leurs caractéristiques et donc leurs propriétés (Cesena *et al.*, 2001). Les Lactobacilli sont capables de former des biofilms qui sont vraisemblablement un atout pour leur action bénéfique mais d'un point de vue industriel, l'attachement des bactéries entre-elles ou à une surface, pose un problème lors de la numération des Unités Formant Colonies (UFC), seul test habilité à quantifier les bactéries aux stades ultimes de la production industrielle.

C'est dans ce contexte, que je participe aujourd'hui à l'encadrement d'une thèse (Manjyot Kaur) en collaboration avec la société Biose et financée par la société, qui vise à mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés aux différents modes de vie de souches de lactobacilles. Pour ce faire, nous avons sélectionné des mutants spontanés d'une souche de *Lactobacillus gasseri* (i) ayant perdu la capacité à s'auto-agrégier et (ii) formant des biofilms importants sur surface abiotique (**Figure 8**).

ou dans le métabolisme des sucres (DeoR, protéine contenant un domaine de cassette de liaison à l'ATP). L'analyse par RT-qPCR (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction) a montré une expression accrue du gène *ywqD* chez les deux mutants. Les résultats préliminaires de cette étude en cours indiquent clairement que les lactobacilles peuvent croître selon deux modes de vie différents, chacun étant probablement gouverné par la régulation de la production de polysaccharides capsulaires (CPS).

2.2. *Klebsiella pneumoniae* : modèle d'étude d'un pathogène opportuniste capable de former du biofilm

L'équipe CMES (Communautés microbiennes : écotoxicologie-santé) du Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, possède une véritable expertise de *Klebsiella pneumoniae*, une entérobactérie ubiquiste naturellement présente dans l'environnement et retrouvée à l'état commensal dans le tube digestif et les cavités naturelles de l'homme. *K. pneumoniae* est responsable d'infections associées aux soins (prévalence des patients infectés de 4,97 %), au niveau respiratoire, systémique, urinaire et hépatique. Un portage intestinal de ce pathogène est trouvé chez environ 6% des populations communautaires et 19% des patients ayant reçu des soins récents (Gorrie *et al.*, 2017). La colonisation intestinale représente un facteur de risque important pour les patients en unité de soins intensifs avec ~50% des infections à *K. pneumoniae* résultant de la contamination des patients par leur propre microbiote (Gorrie *et al.*, 2017).

K. pneumoniae est reconnu comme le 4^{ème} agent étiologique de pneumonies associées à une ventilation mécanique (PAVM) en France (Réa-Raisin) avec une surmortalité de 5 à 13%. Cet agent pathogène est particulièrement problématique car il développe de façon croissante et préoccupante une multirésistance aux antibiotiques. Ainsi, *K. pneumoniae* est un pathogène opportuniste considéré par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et les Centres pour le contrôle et la prévention des maladies (Center for Disease Control and Prevention : CDC) comme une menace majeure de santé publique. Des souches pan-résistantes de *K. pneumoniae* ont déjà été isolées et certaines possèdent des facteurs d'hypervirulence. Depuis 2013, le CDC a déclaré un état d'urgence concernant la résistance aux carbapénèmes des entérobactéries, avec le niveau de menace le plus élevé. Ces fortes capacités de résistance aux antibiotiques sont encore majorées par la capacité à former du biofilm, un mode de vie qui interfère avec la diffusion des agents anti-infectieux et qui contribue à la formation de formes cellulaires

dormantes. Le processus de formation de biofilm par *K. pneumoniae* est bien décrit, notamment par des études menées au laboratoire (Joseph *et al.*, 2021). Il fait intervenir un ensemble de facteurs de pathogénicité (pili, LPS, capsule) régulés intrinsèquement mais aussi *via* des phénomènes de Quorum Sensing (QS). De ce fait, cibler le biofilm est une approche thérapeutique susceptible d'inhiber le développement de bactéries opportunistes telle que *K. pneumoniae* et donc le développement d'infections.

a. Activités anti-biofilm de bactéries probiotiques vis-à-vis de pathogènes opportunistes

L'utilisation de souches probiotiques est une perspective originale, non seulement pour leur pouvoir de compétition vis-à-vis du pathogène au sein d'un écosystème mais également pour leur activité anti-biofilm (Miquel *et al.*, 2016a). Dans ce cadre, j'ai participé à l'encadrement de la thèse de doctorat de Rosyne Lagrafeuille intitulée : « Activités anti-biofilm de bactéries probiotiques vis-à-vis de pathogènes ». A mon arrivée au laboratoire en 2014, j'ai apporté à ce projet des compétences techniques sur les différents modèles envisagés mais aussi ma connaissance des probiotiques (caractérisations, législation) et mon réseau professionnel.

La recherche d'une activité anti-biofilm dans le surnageant de culture de lactobacilles (environ 150 souches différentes obtenues grâce à une collaboration mise en place avec le laboratoire ProbiHôte) vis-à-vis des bactéries pathogènes, *K. pneumoniae* et *Staphylococcus epidermidis*, a permis de sélectionner des souches d'intérêt avec une activité anti-biofilm sans effet bactéricide (Lagrafeuille *et al.*, 2018). Parmi ces souches, *Lactiplantibacillus plantarum* (Ex. *Lactobacillus plantarum*) CIRM653 s'est avérée capable d'induire une surexpression des pili de type 3. L'activité de *L. plantarum* CIRM653 contre *K. pneumoniae* a été évaluée dans des modèles murins que j'ai mis en place au laboratoire :

- **Un modèle de colonisation intestinale** : Dans ce modèle la présence de *L. plantarum* CIRM653 augmente de façon surprenante le taux de colonisation intestinale par *K. pneumoniae* (**Figure 9A**) (Lagrafeuille *et al.*, 2018). Une autre étude à laquelle j'ai participé, portant sur des cellules de *K. pneumoniae* dispersées d'un biofilm mature, montre une adaptation transcriptionnelle de celles-ci et une augmentation de leurs capacités d'adhésion *in vitro* et de virulence *in vivo* (Guilhen *et al.*, 2019). Ainsi, nous avons formulé l'hypothèse suivante : l'effet anti-biofilm de la souche *L. plantarum*

CIRM653 est dû à une augmentation de la dispersion de *K. pneumoniae* à partir d'un biofilm formé au niveau intestinal.

- **Un modèle d'infection pulmonaire (Figure 9B)** : Dans ce modèle, l'administration orale de *L. plantarum* CIRM653 à des souris infectées par *K. pneumoniae* par voie nasale réduit la charge bactérienne ainsi que la réponse à l'inflammation pulmonaire, avec une diminution du nombre de cellules immunitaires (macrophages et neutrophiles) et de cytokines (KC, IL-6 et TNF- α) dans le liquide broncho-alvéolaire (Vareille-Delarbre *et al.*, 2019).

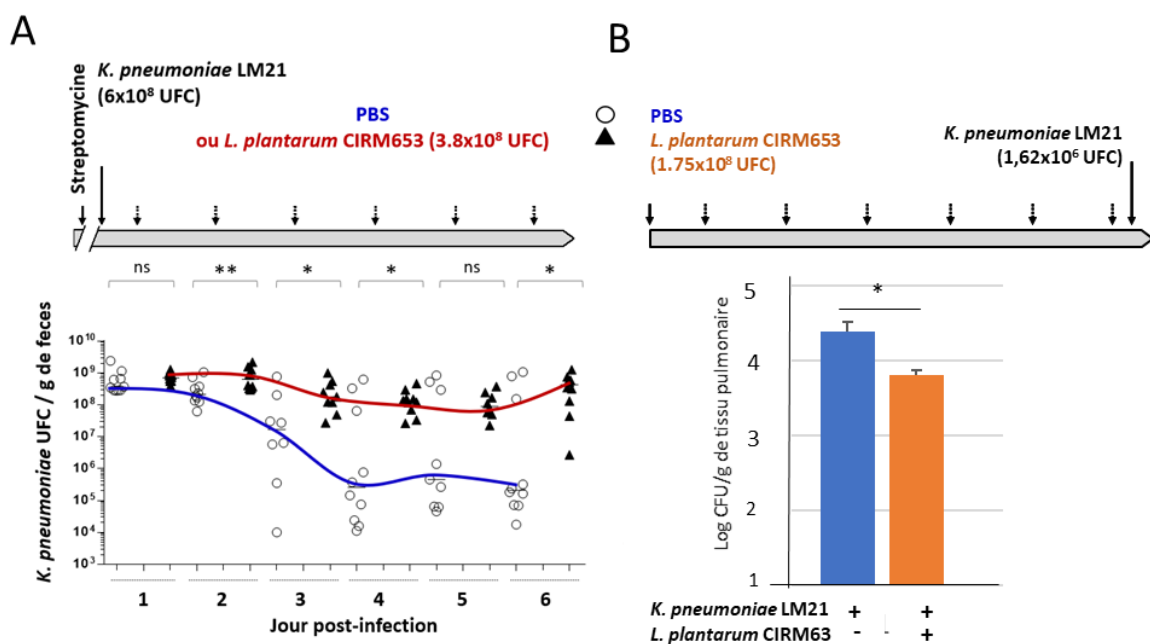


Figure 9. Modèles murins de colonisation et d'infection à *K. pneumoniae* développés au laboratoire. **A. Colonisation intestinale après gavage.** Après 48 h de traitement à la streptomycine (5 g/L dans l'eau potable), des souris ont été inoculées par voie intragastrique avec *K. pneumoniae* LM21, puis ont été traitées par la souche *Lactobacillus plantarum* CIRM653 (triangles noirs) ou PBS (contrôle, cercles vides) pendant 6 jours. **B. Infection pulmonaire induite par instillation nasale.** Des souris ont été inoculées quotidiennement par gavage oral avec *L. plantarum* CIRM653 ou du PBS comme témoin pendant 7 jours. Le jour 7, les animaux ont été infectés par voie intranasale avec 25 μ L d'une suspension de *K. pneumoniae* LM21 et la charge bactérienne a été évaluée dans les tissus. ns = aucune différence significative; * P<0,05 et ** P<0,01. D'après Lagrèfeuille *et al.*, 2018 et Vareille-Delarbre *et al.*, 2019.

Ces résultats antinomiques montrent une activité bénéfique de *L. plantarum* CIRM653 sur son hôte lors de l'infection pulmonaire par *K. pneumoniae* mais délétère lors de la colonisation intestinale par ce pathogène opportuniste. En effet, la modulation à distance de la réponse inflammatoire de *K. pneumoniae* par *L. plantarum* CIRM653 soutient le concept d'immunomodulation par les bactéries bénéfiques à travers l'axe intestin-poumon (Vareille-Delarbre *et al.*, 2019). Cependant, au niveau intestinal, en absence de réponse inflammatoire vis-à-vis du pathogène, les mécanismes anti-biofilm décrits pour cette souche *in vitro* ne sont pas favorables à l'élimination du pathogène (Lagrafeuille *et al.*, 2018).

Pour aller plus loin dans l'élaboration d'une stratégie thérapeutique prophylactique permettant de limiter la colonisation intestinale et donc le risque infectieux associé, il est donc nécessaire de mieux comprendre le comportement de *K. pneumoniae* au sein du microbiote intestinal.

b. Colonisation intestinale : facteurs de pathogénicité de *K. pneumoniae* et dysbiose

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, retrouvées chez plus d'un quart des Protéobactéries. Ils sont impliqués dans la sécrétion d'effecteurs toxiques dans des cellules procaryotes et/ou eucaryotes adjacentes par contact direct (Cascales, 2008). La régulation de ce système est stimulée par différents stress environnementaux, propres à chaque espèce (Singh and Kumari, 2023). Le SST6 a été récemment décrit dans les clones hypervirulents de *K. pneumoniae* comme étant impliqué dans la virulence et la compétition intra-espèces et inter-espèce mais seulement vis-à-vis d'autres entérobactéries (*E. coli* et *S. Typhimurium*) (Liu *et al.*, 2023). Cependant, il reste mal décrit dans les souches classiques de *K. pneumoniae* (cKp). L'objectif du travail de thèse de Thomas Merciecca (Financé par un contrat doctoral), que j'ai co-encadré de 2019 à 2022, était d'analyser la prévalence du SST6 et de ses effecteurs dans différents génomes du genre *Klebsiella spp.*, ainsi que d'étudier leur rôle dans la colonisation intestinale et leur régulation transcriptionnelle (Merciecca *et al.*, 2022) (**Annexe 1**).

La présence de multiples opérons SST6 au sein des génomes bactériens est largement répandue chez les bactéries à Gram négatif (Journet and Cascales, 2016). Une approche *in silico*, en collaboration avec Olaya Rendueles (Centre de Biologie Intégrative (CBI) de

Toulouse, Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires (LMGM)), a permis d'identifier la présence d'un à quatre opérons SST6 dans 427 génomes de *Klebsiella* (moyenne de 1.99 clusters par génome), avec une forte prévalence de ce SST6 au sein de l'espèce *K. pneumoniae*, indépendamment de l'origine des souches. La présence de deux opérons (SST6-1 et -2) a été mise en évidence dans le modèle d'étude, la souche clinique de référence CH1157 (identique à la souche CH1476 mais celle-ci est délétée du gène *shv* pour faciliter sa manipulation génétique), contenant respectivement deux gènes codant des effecteurs de type phospholipase (*tle1*) et endopeptidase (*tke*), également identifiés dans d'autres génomes de *K. pneumoniae* (**Figure 10A**). La présence au niveau périsplasmique de Tle1 et Tke en système hétérologue chez *E. coli* DH5 α altère la capacité de croissance ainsi que la perméabilité membranaire. Ces résultats suggèrent une activité antibactérienne médiée par les effecteurs du SST6, lui-même mis en œuvre dans un environnement stressant tel que le tractus gastro-intestinal.

L'impact du SST6 sur le microbiote a été investigué grâce à l'utilisation d'un modèle murin de colonisation gastro-intestinale par la souche CH1476 sauvage versus des mutants isogéniques invalidés pour le SST6-1, chez des souris traitées à la streptomycine. Les mutants montrent une moindre capacité de colonisation du tractus gastro-intestinal à long terme par rapport à la souche sauvage. L'analyse du microbiote fécal par séquençage à haut débit de l'ADNr 16S, en collaboration avec l'UMR-F Aurillac, a mis en évidence une dysbiose du microbiote intestinal 50 jours post infection par la bactérie productrice de SST6-1, impactant sa richesse, sa diversité et sa résilience, avec une absence spécifique de la famille des *Oscillospiraceae* (**Figure 10BC**). L'ensemble de ces résultats souligne un rôle majeur de ce facteur de pathogénicité chez *K. pneumoniae* dans les interactions hôte-pathogène.

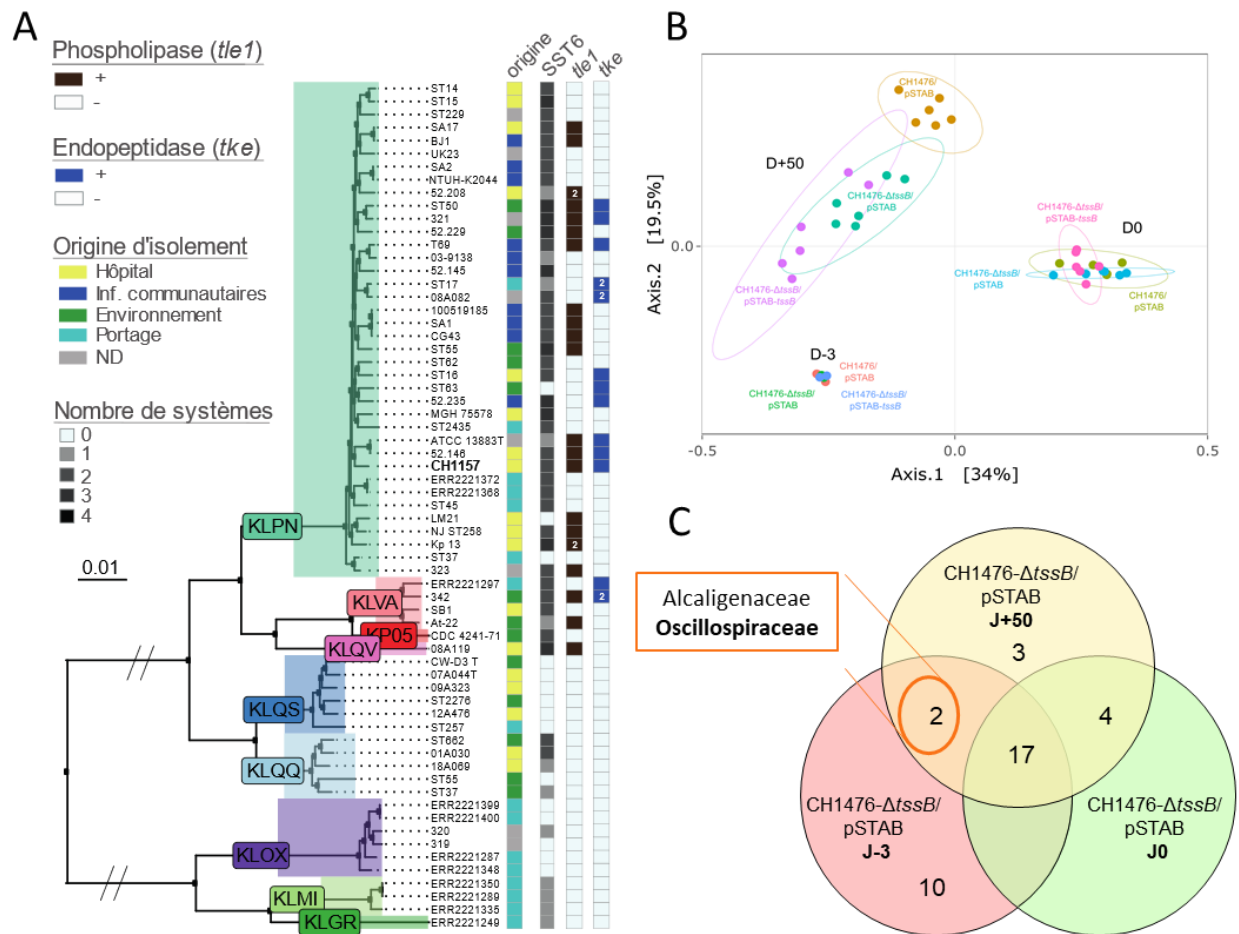


Figure 10. Rôle du Système de sécrétion de type VI (T6SS) de *Klebsiella pneumoniae* dans la colonisation gastro-intestinale. **A.** Arbre non-enraciné construit à partir de 2969 génomes représentatifs du genre *Klebsiella*. La première colonne indique l'environnement dans lequel les souches ont été isolées (ND non déterminé). La deuxième colonne indique le nombre de T6SS par génome. Les deux dernières colonnes indiquent la présence ou l'absence de gènes codant des phospholipases et des endopeptidases (avec au moins 80 % et 50 % d'identité avec ceux trouvés dans les groupes de T6SS, respectivement). KLPN : *K. pneumoniae* ; KLVA : *K. variicola* ; KP05 : *K. pneumoniae* 05 ; KLQV : *K. quasiuariicola* ; KLQS : *K. qs similipneumoniae* ; KLQQ : *K. qs quasipneumoniae* ; KLOX : *K. oxytoca* ; KLMI : *K. michiganensis* ; KLGR : *K. grimontii*. **B.** Diagramme d'analyse en coordonnées principales (PCoA) du microbiote intestinal basé sur les résultats de l'échelle multidimensionnelle non métrique UniFrac non pondérée (NMDS). Chaque point représente une souris. **C.** Diagrammes de Venn représentant le nombre de familles bactériennes partagées dans le microbiote fécal de souris infectées par un mutant T6SS-1 (CH1476- Δ tssB/pSTAB) à différents temps. D'après Merciecca *et al.*, 2022

Projet de recherche : Colonisation intestinale par *Klebsiella pneumoniae* : mécanismes et stratégies de prévention

Sans éliminer les risques de contaminations exogènes, l'association entre colonisation intestinale et développement d'infections pulmonaires à *K. pneumoniae* suggère fortement l'existence d'une dissémination bactérienne endogène chez les patients à partir du tractus digestif. Deux hypothèses sont formulées dans la littérature : i) une dissémination via la sphère oropharyngée facilitée par la présence de dispositifs médicaux ou ii) une translocation intestinale directe liée à la modulation des barrières intestinales (mucus et épithélium) dans un contexte polymicrobien et immunitaire affaibli.

Les processus infectieux bactériens ont été principalement étudiés au niveau individuel, sans tenir compte de l'environnement microbien. La prise en compte croissante du microbiote incite les communautés de microbiologistes à revoir leurs concepts, puisque les interactions des agents pathogènes avec les membres résidents du microbiote sont inévitables. Cependant, les mécanismes permettant aux pathogènes de survivre, d'établir des niches et de proliférer au sein d'écosystèmes aussi compétitifs, sont encore peu connus. Nous avons récemment pu montrer l'implication du SST6 de *K. pneumoniae* dans la colonisation intestinale à long terme et la dysbiose du microbiote (Merciecca *et al.*, 2022). Il semble donc primordial de comprendre le processus de colonisation du tractus gastro-intestinal, qui conduit à la formation d'un réservoir, et notamment les interactions de ce pathogène opportuniste avec le microbiote intestinal.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent les différents axes du projet de recherche que je propose de développer, avec trois parties principales articulées avec des degrés croissants de prise de risque scientifique. L'objectif est de déchiffrer la régulation et les fonctions des SST6 de *K. pneumoniae* afin d'envisager des approches thérapeutiques innovantes.

Partie 1 Comprendre les mécanismes moléculaires régissant la colonisation intestinale par *K. pneumoniae* : Rôles des SST6

1.1 Régulation de l'expression des SST6 de *K. pneumoniae*

La présence de multiples opérons codant des SST6 au sein des génomes de *K. pneumoniae* soulève des interrogations quant à leur interdépendance et leur régulation. Différents stress environnementaux activent l'expression des SST6 de souches de *K. pneumoniae* hypervirulentes (la présence de molécules antimicrobiennes et des stress osmotiques, acides et oxydatifs) (Barbosa and Lery, 2019; Hsieh *et al.*, 2019; Storey *et al.*, 2020). Barbosa et Lery ont mis en évidence *in silico* plusieurs sites de fixation de régulateurs transcriptionnels au niveau des opérons SST6 dans trois souches hypervirulentes de référence NTUH-K2044, Kp52.145 et HS11286 dont six sont communs : H-NS, OxyR, OmpR, Fis, GcvA et RcsAB (Barbosa and Lery, 2019). Bien que les opérons SST6-1 et -2 de la souche classique CH1157 soient fortement homologues aux opérons codant les SST6 des souches NTUH-K2044 et HS11286, leur régulation transcriptionnelle semble être distincte et faire intervenir des régulateurs spécifiques.

♦ Résultats préliminaires

Dans la souche classique de référence de notre étude CH1157, la présence de 2 régions promotrices au niveau du SST6-1 a été mise en évidence *in silico* grâce à l'utilisation du logiciel BPROM (**Figure 9**). La première est localisée en amont de l'opéron avant le gène *tssB* et comporte 3 sites de fixations potentiels pour des régulateurs transcriptionnels : ArgR, Fnr, et RpoD (σ_{70}) (**Figure 9A**). Une 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 11A**). 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 sélectivement la surexpression des gènes *tssB*, *tssC*, *tssK*, *tssL*, *ompA* et *hcp*. *In-vitro*, plusieurs sites de fixations transcriptionnels potentiels ont été identifiés dans cette souche au niveau du promoteur du SST6-1 (ArgR, Fnr, LexA). En utilisant une approche de « régulateurs capture », nous avons montré que la région promotrice du T6SS-1 de la souche CH1157 est effectivement

capable de lier ArgR et Fnr, l'activateur transcriptionnel associé aux conditions anaérobies (Figure 11B). 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.

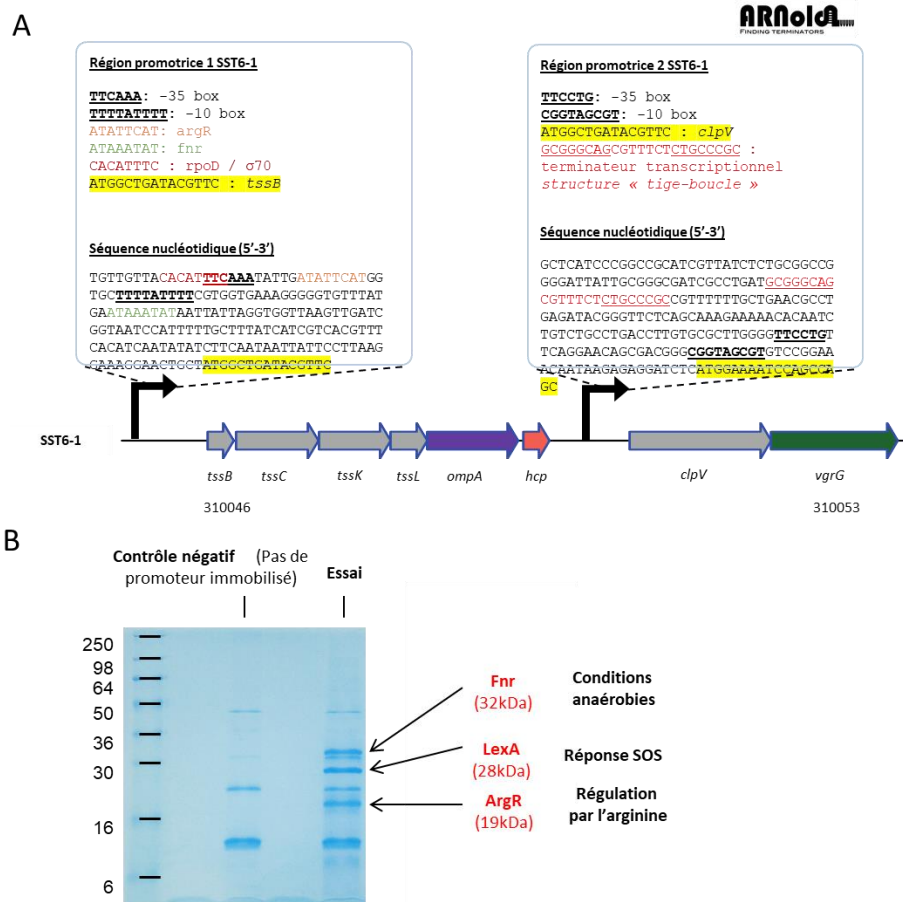


Figure 11. Régions promotrices du SST6-1 de la souche *K. pneumoniae* CH1157. (A) Représentation schématique des régions promotrices et des sites potentiels de fixation de régulateurs transcriptionnels du SST6-1 (5'-3') identifiés par analyse in silico des séquences nucléotidiques de la souche CH1157 (<http://www.softberry.com>). La présence de sites de fixation est reportée en couleur. **(B)** Identification des régulateurs transcriptionnels du SST6-1 par analyse «promoter capture». Le principe repose sur l'amplification génique d'une région promotrice d'intérêt avec des amorces biotinylées et la fixation du fragment d'ADN obtenu sur des billes magnétiques de streptavidine. Un lysat bactérien est ensuite mis au contact des billes pour identifier les interactions de la région promotrice avec de potentiels régulateurs transcriptionnels. Cet échantillon ainsi que son contrôle ne contenant que des billes sont ensuite séparés sur gel SDS-PAGE pour la visualisation des interactions. Les bandes apparaissant dans la piste contrôle correspondent à des protéines ubiquitinylées chez *K. pneumoniae*. Ainsi, quatre bandes différentielles de poids moléculaires respectifs de 8, 19, 28 et 32 kDa ont été observées dans l'échantillon promoteur immobilisé et analysées en spectrométrie de masse. Trois régulateurs transcriptionnels ont ainsi été identifiés : ArgR (19kDa), Fnr (32kDa) et LexA (28kDa). La 4^{ème} bande excisée correspond à un produit de dégradation de LexA (8kDa).

L'impact de la présence du SST6-1 de la souche CH1157 sur le microbiote intestinal en modèle murin atteste de son activité dans les conditions du tractus digestif. Ainsi, le rôle de différentes conditions de cultures (mimant le tractus digestif ou inspirées de la littérature) sur l'expression des gènes codant les SST6 a été évalué *in vitro* par RT-qPCR. Les résultats préliminaires ont montré l'activation du SST6-1 dans trois conditions :

i) en présence de molécules antibactériennes (antibiotique 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 activé en présence de β -lactamines (ceftazidime, méropénème) et d'apramycine (Liu *et al.*, 2017). Ces résultats sont également à mettre en lien avec les observations cliniques chez les patients. En effet, l'administration d'antibiotiques est le facteur de risque principal pour le développement d'une dysbiose, favorisant la survenue d'une infection chez un hôte préalablement colonisé par *K. pneumoniae* (Lange *et al.*, 2016). Ainsi, 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 d'accroître sa virulence et son pouvoir de dissémination.

ii) en présence de stress spécifiques du tractus digestif (milieux conditionnés par la présence de cellules TC7 ou en présence de sels biliaires). Une surexpression du gène *hcp* de la souche *K. pneumoniae* NTUH-K2044 est observée lors d'une co-incubation avec des cellules épithéliales intestinales Caco-2 (Hsieh *et al.*, 2019). Les sels biliaires (acide cholique et désoxycholique) sont également capables de moduler positivement l'expression du gène *tssB* du SST6-1 chez *Salmonella* Typhimurium (Sana *et al.*, 2016) et *E. coli* AIEC LF82 (données personnelles) ce qui semble montrer une adaptation des pathobiontes à leur niche écologique.

iii) en présence d'arginine. L'arginine est un acide aminé retrouvé libre dans le tractus digestif en grande concentration en post-prandial du fait du métabolisme protéolytique (Adibi and Mercer, 1973). Aucune régulation de l'expression des gènes codant les SST6 par l'arginine ou son senseur, le régulateur transcriptionnel ArgR (Arginine repressor), n'a été mise en évidence. Cependant, chez *E. coli* entérohémorragique et *Citrobacter rodentium*, l'arginine régule, via une activité activatrice de ArgR, l'expression de facteur de virulence et notamment l'expression du SST3 (Menezes-Garcia *et al.*, 2020).

♦ Perspectives d'étude

L'ensemble de ces résultats est en faveur d'une activation du SST6-1 dans les conditions retrouvées *in vivo* au niveau du tractus digestif, mais les données doivent être validées dans d'autres conditions expérimentales, notamment en environnement anaérobie. De plus, un suivi de l'expression du SST6 *in vivo* sera réalisé à partir de contenu caecal ou marquage par immunofluorescence de la protéine Hcp (Western-blot avec des anticorps anti-Hcp (Hsieh *et al.*, 2019)) sur des cryosections de colon de souris infectées par la souche *K. pneumoniae* CH1476 sauvage et ses mutants dérivés du SST6-1 (CH1476- $\Delta tssB$ et CH1476- $\Delta tssB/pSTAB-tssB$). Dans un tel modèle, d'autres marqueurs d'intérêt seront suivis, notamment les concentrations en arginine et AGCC ou la présence de certaines bactéries cibles (**cf partie 1.2**).

Pour fournir une vue plus exhaustive des mécanismes de régulation potentiellement impliqués, ces résultats seront validés avec des souches cliniques (**cf partie 2.1**). Une analyse comparative des clusters sera réalisée *in silico* pour évaluer le niveau de synténie des différents systèmes au sein des souches et l'existence de sites consensus pour la fixation de régulateurs dans les régions promotrices. Les données prédictives seront ensuite testées dans des expériences *in vitro* (expression des gènes T6SS, Western-blot, Electrophoretic mobility shift assay) sur des bactéries cultivées dans différentes conditions mimant les différents compartiments du tractus gastro-intestinal, estomac, intestin grêle et différentes régions du côlon (Simulated Human Intestinal Microbial Ecosystem : SHIME (Van de Wiele *et al.*, 2015)).

Ce travail sera poursuivi et valorisé notamment via une collaboration avec Eric Cascales (LISM - Laboratoire d'ingénierie des systèmes macromoléculaires de Marseille) et Olaya Rendueles Garcia (Centre de Biologie Intégrative (CBI) de Toulouse, Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires (LMGM)).

1.2 Caractérisation des cibles des T6SSs de *K. pneumoniae*

Les SST6-1 et -2, comportant deux toxines distinctes Tle1 et Tke, pourraient avoir des rôles spécifiques mais complémentaires dans l'établissement d'une compétition envers les communautés microbiennes complexes comme celle du microbiote intestinal. La connaissance

du T6SS dans son holobionte est nécessaire au regard de la diversité des effecteurs du T6SS (phospholipase Tle1 et endopeptidase Tke) (Merciecca *et al.*, 2022). L'identification des bactéries ciblées ainsi que les effets sur les cellules épithéliales eucaryotes seront étudiés à la fois *in vitro* et *in vivo*.

a. Quelles sont les proies bactériennes ciblées par les T6SS de *K. pneumoniae* dans le microbiote intestinal ?

Une activité antibactérienne médiée par *K. pneumoniae* **T6SS-1** a été mise en évidence *in vitro* lorsque l'effecteur **Tle1** est produit dans le compartiment périsplasmique d'*E. coli*. Des essais *in vivo* ont indiqué que les membres de la famille Oscillospiraceae sont des compétiteurs potentiels pour l'établissement à long terme de *K. pneumoniae* dans l'intestin (Merciecca *et al.*, 2022). L'activité antibactérienne du T6SS de *K. pneumoniae* sera évaluée sur ces cibles en utilisant des représentants cultivables de cette famille (notamment le genre *Faecalibacterium*). Seront également testées des espèces bactériennes représentatives des phyla majeurs composant un microbiote intestinal physiologique tel qu'il a été conçu avec le modèle murin Oligo-Mouse-Microbiota¹² (Oligo-MM¹²) (Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobactérie, Betaprotéobactérie et Verrucomicrobia) (Brugiroux *et al.*, 2016). Pour cela une approche *in vitro*, adaptée aux contraintes de chacune des espèces (anaérobiose stricte, P2) sera utilisée. Ces manipulations consistent à mettre en contact une bactérie attaquante possédant un SST6 (*K. pneumoniae* CH1157) avec une bactérie cible, et à quantifier la survie de cette dernière. Des analyses métabolomiques compléteront cette approche en dosant des marqueurs clés, par exemple les AGCC (butyrate, acétate, lactate propionate). De plus, 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 (Liu *et al.*, 2017). 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 12A**). Une approche de mutagénèse dirigée du gène *tle1* permettra de vérifier l'abolition de la toxicité médiée par cet effecteur.

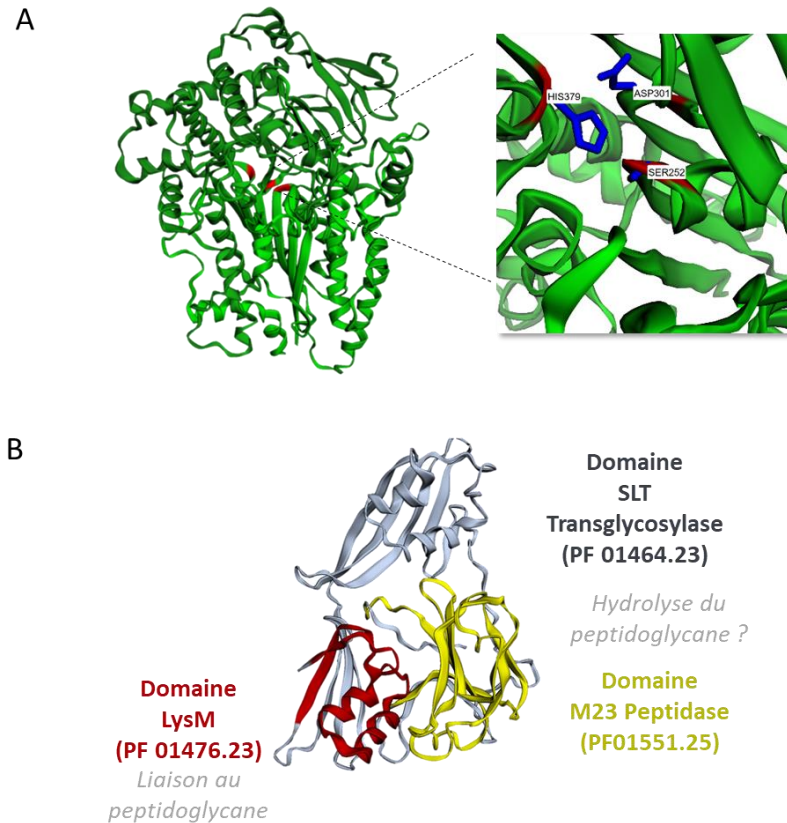


Figure 12. Modélisation 3D des potentielles toxines associées aux SST6 de la souche *K. pneumoniae* CH1157. A. Modélisation de la phospholipase Tle1. La région de la protéine contenant la triade catalytique S252-D301-H379 (rouge et bleue) est agrandie dans le carré de droite. B. Modélisation 3D de l'endopeptidase Tke. Ces modélisations ont été réalisées grâce au software en ligne EzMol (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/ezmol/>).

Concernant le deuxième SST6 identifié dans la souche de *K. pneumoniae*, **SST6-2**, un nouvel effecteur potentiel a été identifié, **Tke**, pour « Type VI *Klebsiella* effector » (**Figure 12B**). Il partage des homologies de séquences avec certains effecteurs déjà décrits dans d'autres genres bactériens au niveau des domaines protéiques conservés. C'est le cas des amidases Tae et des métalloendopeptidases Tpe d' *Acinetobacter* (Ringel *et al.*, 2017). Tae possède une activité antibactérienne directe contre *E. coli* en ciblant le peptidoglycane bactérien, tandis que Tpe est impliqué dans la compétition intra-espèce (test réalisé contre une souche dérivée délétée du système toxine antitoxine Tpe-Tpi) (Ringel *et al.*, 2017). De plus, le domaine SLT transglycolase (PF 01464.23) retrouvé dans l'effecteur Tke est également présent dans les effecteurs de toxines hydrolysant les polysaccharides chez *K. pneumoniae* (Li *et al.*, 2022). Un

effecteur décrit chez *Acinetobacter baumannii* (Tse4) possède les trois 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 décrit possédant une activité antibactérienne contre des bactéries à Gram négatif et Gram positif (Le *et al.*, 2021). Ces observations suggèrent un rôle de Tke dans la compétition inter-bactérienne contre des cibles bactériennes à Gram positif, une perspective qui sera testée. Le rôle du domaine LysM reste encore à déterminer ; il pourrait être crucial dans l'ancrage de l'effecteur au peptidoglycane (Jurénas and Cascales, 2022). Une délétion de ce domaine, ou une fusion en partie N-terminale d'un effecteur déjà caractérisé, permettra de vérifier l'ancrage d'un effecteur du SST6 dans le peptidoglycane bactérien *via* LysM. Enfin, chez *A. baumannii*, l'activité enzymatique de Tse4 est augmentée en condition basique (pH=8.0) et inhibée à pH acide (6.8) (Le *et al.*, 2021). Chez *K. pneumoniae*, de telles conditions basiques pourraient 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.

b. Quel est le rôle du mode de vie « biofilm » ?

♦ Résultats préliminaires

Les bactéries commensales des microbiotes colonisant les epithelia sont capables de s'entourer de matrices exopolysaccharidiques et de se regrouper afin d'accroître leur résistance aux pathogènes ; ces regroupements sont considérés comme des biofilms (Motta *et al.*, 2021). Chez plusieurs espèces bactériennes, une étroite relation entre la capacité d'une bactérie à former du biofilm et la présence de SST6 a été décrite. Si la capacité à former du biofilm est inhibée chez les souches mutées dans les gènes du SST6 chez *P. aeruginosa* et *E. coli* (Aschtgen *et al.*, 2008; Gallique *et al.*, 2017), elle est augmentée chez *A. baumannii* (Dong *et al.*, 2022). Concernant *K. pneumoniae*, d'après Zhang *et al.*, les souches possédant un SST6 ne forment pas plus ou moins de biofilms par rapport aux souches SST6 négatives (n=119) (Zhang *et al.*, 2022). Cependant, des résultats différents ont été obtenus au laboratoire : la formation de biofilm quantifiée par coloration au Crystal Violet (CV) est plus importante à 4h et 24h pour la souche CH1476 délétée du SST6-1 comparativement à la souche contrôle, phénotype restauré par trans-complémentation avec le gène *tssB*.

♦ Perspectives d'étude

Les résultats préliminaires suggèrent une modification de la production de matrice exopolysaccharidique car aucune différence significative n'est retrouvée en termes de nombre de bactéries viables dénombrées. Le dosage des exopolysaccharides, notamment capsulaires (acide uronique) couplé à des observations en microscopie permettront d'apprécier la structure de la matrice exopolysaccharidique formée par CH1476 et ses différents mutants du SST6. Ces observations seront réalisées à partir de biofilms bactériens obtenus dans des systèmes cinétiques disponibles au laboratoire (BioFlux), permettant de faire varier certains paramètres pour se rapprocher des conditions *in vivo* (maîtrise du flux, température constante, microscopie en temps réel) et d'éviter l'épuisement du milieu et l'accumulation des déchets toxiques.

La forme biofilm est hautement compétitive et la présence d'un SST6 pourrait être un élément essentiel à la survie du pathogène dans cette situation, comme il a déjà été montré avec le SST6 de *B. thailandensis*, dans un biofilm mixte avec *P. putida* (Schwarz *et al.*, 2010). Ainsi, la capacité à former du biofilm de la souche CH1476 et des mutants invalidés dans les SST6 sera testée en condition « multi-espèces », c'est à dire en présence de représentants anaérobies du microbiote intestinal. Cette approche permettra de tester les capacités antibactériennes du SST6 de *K. pneumoniae* en condition biofilm et de les comparer à celles déterminées précédemment sous la forme planctonique. Ces expériences seront réalisées en collaboration avec le Dr. JP Motta (INSERM, Institute of Digestive Health Research (IRSD), Toulouse) pour l'utilisation du « Calgary biofilm device » permettant de travailler dans des conditions d'anaérobiose (Motta *et al.*, 2021).

Par ailleurs, la mixité des espèces au sein de biofilms polymicrobiens soulève une question importante : le SST6, une arme antibactérienne par définition, peut-il également être utilisé comme un dispositif de communication dans un dialogue moléculaire avec d'autres espèces au sein d'un biofilm ? Ce phénomène de reconnaissance médié par le SST6 a déjà été décrit chez plusieurs espèces capables de discerner les attaques de compétiteurs des attaques d'individus « alliés » (Speare *et al.*, 2022). Storey *et al.* ont montré que *K. pneumoniae* Kp52.145 est capable de percevoir 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 ; elle pourrait alors représenter un réel avantage dans les biofilms mixtes. Ces résultats suggèrent que *K. pneumoniae* utilise son SST6 en réponse à une attaque extérieure, correspondant plus à

un système de défense capté par PhoPQ après perturbation de l'intégrité membranaire *via* le SST6 de la bactérie attaquante. La présence d'un SST6 chez les bactéries cibles potentielles sera investiguée pour conclure sur sa nécessité dans l'induction d'une riposte par *K. pneumoniae*.

Un sujet de stage de M2 Microbiologie est proposé sur les aspects proposés en partie I, avec l'intention de poursuivre dans le cadre d'une thèse d'université.

Partie 2 : De la colonisation à l'infection

Le décryptage du rôle des SST6 dans la colonisation intestinale par l'étude des cibles bactériennes des effecteurs et de la régulation des gènes ne permet pas de replacer son implication dans un contexte physiopathologique. Pour cela, il est nécessaire de développer des modèles originaux pour l'étude des interactions hôte/pathogènes mais aussi hôte/microbiote/pathogènes.

2.1. Caractérisation d'une collection de souches cliniques

♦ Résultats préliminaires

Pour mieux comprendre les processus physiopathologiques liés aux infections à *K. pneumoniae*, il est nécessaire de disposer d'un plus grand nombre de souches cliniques classiques (non hypervirulentes) modèles. Ainsi, des souches de *Klebsiella spp.* ont été isolées chez des patients de service de réanimation et caractérisées *in vitro*. Ces isolats sont des duos de souches (concordantes en ERIC-PCR), présentant des sérotypes capsulaires variés, obtenues séquentiellement chez plusieurs patients ayant développé des bactériémies à *K. pneumoniae*, d'abord dans leurs selles puis lors d'hémoculture. Elles ont été collectées rétrospectivement grâce à une collaboration avec les services de réanimation du CHU de Clermont-Ferrand (Pr. Bertrand Souweine) et le CNR entérobactéries de Clermont-Ferrand (Pr. Richard Bonnet).

Une question reste en suspens dans la littérature : « Quelle voie de dissémination de *K. pneumoniae* dans l'organisme aboutit à l'infection ? ». L'analyse de notre collection de souches cliniques permettra de caractériser les facteurs impliqués dans ce processus et de tester l'hypothèse d'une translocation directe au niveau intestinal. Toutes les souches isolées de patients adhèrent aux cellules épithéliales intestinales, quelle que soit leur capacité de formation de biofilm sur surface abiotique. Les processus de translocation (passages trans ou paracellulaires) des souches classiques de notre collection ont été explorés *in vitro* par des tests d'invasion en microplaques, les mesures de TEER (Résistance Electrique TransEpithéliale) sur Trans-Well et l'immuno-marquage de la protéine de jonction serrée ZO-1 (Zonula-Occludens 1). Les premiers résultats obtenus lors du stage de Master 2 de Cécile Gosset indiquent que ces souches ne sont pas capables de transloquer activement au travers de la barrière épithéliale intestinale par une voie intra- ou paracellulaire. Cependant, la caractérisation phénotypique a permis de montrer que les souches isolées des hémocultures forment globalement plus de

biofilm (coloration CV) et sont plus résistantes à l'ampicilline que celles isolées des selles. Une comparaison par séquençage complet des génomes de 5 paires de souches a été réalisée pour analyser l'évolution des souches au sein même du patient. En l'absence de phénotype hypermutateur (mutation *mutS*), peu de polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) ou de petits INDELS (Inversions/délétions) ont été identifiés entre les souches provenant des selles et du sang. Ces polymorphismes sont principalement associés à des gènes codant des structures de surface (pili, capsule). L'adaptation des souches de *K. pneumoniae* à de nouveaux environnements via la survenue de mutations dans l'opéron capsulaire a déjà été décrit (Nucci *et al.*, 2022). D'autres souches au contraire ont montré des réarrangements importants de leur génome, avec des acquisitions de transposons et de séquences d'insertion, de nombreux plasmides et d'autres éléments génétiques mobiles, soulignant le rôle critique du transfert horizontal de gènes dans la patho-adaptation.

L'ensemble de ces résultats est présenté en **Annexe 2**.

♦ Perspectives d'étude

Nos données préliminaires suggèrent que les souches de *K. pneumoniae* s'adaptent au sein du microbiote de l'hôte avant de disséminer dans la circulation sanguine. Ces changements génétiques pourraient faciliter la translocation intestinale de souches commensales. De plus, certaines adaptations pathologiques bactériennes pourraient favoriser le tropisme des bactéries pour le sang, augmenter le fitness et/ou la virulence bactérien au sein de l'hôte et accroître la résistance/tolérance aux antibiotiques utilisés en clinique.

La collection de souches déjà établie sera enrichie par de nouveaux isolats associés à différents sites d'infections (urine, dispositifs médicaux, poumons) et permettra de réaliser d'autres comparaisons phénotypiques et génotypiques entre i) souches isolées de différents patients pour identifier les caractères bactériens associés à chaque type d'infections mais aussi entre ii) souches isolées d'un même patient afin d'appréhender leur évolution au sein des patients.

La translocation d'une souche de *K. pneumoniae* hypervirulente a été observée chez des animaux immunosénescents déficients pour la production de Gas6 (Growth arrest-specific 6), une protéine synthétisée par les macrophages de la muqueuse intestinale (Tsugawa *et al.*, 2023). Gas6 stimule l'expression des protéines de jonctions serrées (ZO-1, Occludine et E-Cadhérine),

et son absence induit donc une fragilisation de la monocouche cellulaire, qui facilite vraisemblablement le processus de translocation. Ainsi, l'étude de cette voie de contamination endogène nécessite des investigations supplémentaires quant aux interactions entre la bactérie avec les cellules épithéliales et macrophagiques de l'hôte (**cf partie 2.2**). Dans cette optique, je vais mettre en place des modèles de coculture de lignées cellulaires humaines (macrophages (THP-1) et cellules épithéliales intestinales (Caco-2)). De plus des modèles murins, mimant ou non le contexte immunologie des patients à risque, permettront de tester la capacité de souches patho-adaptées à transloquer, à survivre et à se multiplier dans des environnements spécifiques (intestin, sang, poumons). Ces modèles permettront d'évaluer l'impact des patho-adaptations bactériennes dans l'holobionte, c'est-à-dire sur la virulence du pathogène, la réponse immunitaire de l'hôte et la dysbiose du microbiote intestinal.

L'ensemble des résultats initiaux sur la caractérisation génotypique et phénotypique de la collection de souches isolées de patients fait l'objet d'une publication en cours (Annexe 2). Les investigations seront poursuivies avec l'aide d'un interne en master 2 bénéficiant d'une année recherche (Dr. Trabelsi Ahmed). De plus, une demande de financement dans le cadre de l'appel à projet de l'ANR, Projet de Recherche Collaboratif, a été déposée.

2.2. Rôles des SST6 dans les interactions hôte/pathogène

Au sein de l'opéron *SST6-I*, des gènes codant un système toxine-antitoxine ont été identifiés : trois gènes *tli* et un gène *tle1*. Des systèmes toxines-antitoxines similaires (1 gène *tle1* pour 3 *tli*) ont été préalablement identifiés/décrits 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 de type phospholipase qui exerce son activité sur les phospholipides membranaires, indépendamment de la nature eucaryote ou procaryote de la cellule cible. Aucune activité envers les cellules eucaryotes médiée par Tle1 n'a pour l'instant été rapportée dans la littérature, mais d'autres phospholipases sécrétées par le SST6, PldB et Pld1, sont connues pour faciliter l'invasion chez *P. aeruginosa* et augmenter la virulence de *K. pneumoniae* en modèle murin (Jiang *et al.*, 2014; Lery *et al.*, 2014). Ainsi, la production d'une toxine par *K. pneumoniae* capable d'interagir avec les cellules épithéliales intestinales et de

créer une brèche dans la barrière, reste une hypothèse à tester dans des modèles mimant les conditions retrouvées dans le tractus digestif.

Dans un souci éthique de réduction de l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques, certains modèles dynamiques *in vitro* seront mis en place pour étudier l'impact de *K. pneumoniae* et de ses différents SST6 sur des lignées de cellules épithéliales différenciées : intestinales (Caco-2) et pulmonaires (A-549)

a. Interactions *K. pneumoniae* / cellules épithéliales intestinales ?

L'étude de la réponse des cellules épithéliales intestinales à la présence de *K. pneumoniae* sera réalisée dans des systèmes expérimentaux cinétiques permettant d'observer le comportement cellulaire dans des conditions mimant la situation physiologique. Le système microfluidique BioFlux permet de travailler avec des temps de contact (bactéries/cellules) longs car les déchets métaboliques bactériens sont éliminés. Des tests d'adhésion seront réalisés avec des cellules en culture différenciées pour reproduire un tapis cellulaire mimant au mieux l'épithélium constitué. Cette approche d'imagerie originale en cinétique sera réalisée grâce à des lignées cellulaires fluorescentes stables obtenues par transfection de lentivirus. Elle permettra de comparer le tropisme bactérien vis-à-vis de différents epithelia, les phénotypes d'adhésion (biofilm, adhésion diffuse, agrégation...) et d'identifier les facteurs bactériens spécifiquement impliqués.

Si *K. pneumoniae* n'induit pas d'inflammation au niveau des cellules épithéliales intestinales, une réponse inflammatoire médiée par l'inflammasome NLRP3 se produit au contact des cellules épithéliales pulmonaires (thèse de doctorat en cours, Julien Verlaguet). Les mécanismes sous-jacents de cette divergence ne sont pas entièrement compris mais ils sont probablement liés à des différences dans les interactions entre le pathogène et les cellules cibles, qui pourraient impliquer les effecteurs T6SS. En effet, *Edwardsiella tarda* utilise un T6SS pour réguler négativement l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages (BNDM, J77-1), ce qui favorise la colonisation intestinale chez la souris (Chen *et al.*, 2017). Ainsi, les effecteurs des T6SSs ciblant les eucaryotes pourraient protéger *K. pneumoniae* de la réponse immunitaire innée. Pour tester cette hypothèse, des cellules épithéliales intestinales (cellules Caco-2 et HT29) seront infectées par la souche sauvage de *K. pneumoniae* et ses mutants isogéniques T6SSs afin de caractériser les changements dans i) les réponses inflammatoires

(quantification des cytokines par ELISA), ii) l'activation NLRP3 (western-blot et RT-qPCR) et iii) la pyroptose (libération de LDH). Des tests similaires seront réalisés *in vivo* en utilisant un modèle murin de colonisation intestinale (**partie 2.3**).

b. Interactions *K. pneumoniae* / macrophages : modulation de la phagocytose ?

Le rôle du SST6 dans l'échappement phagolysosomal a été démontré dans des modèles bactériens, notamment *F. tularensis*, capable d'accroître sa survie en macrophages via la sécrétion de l'effecteur OpiA (Eshraghi *et al.*, 2016). L'interaction des SST6 de *K. pneumoniae* avec les macrophages n'est que très peu décrite dans la littérature, alors que ce sont des éléments-clés du système immunitaire pour limiter la dissémination de ce pathogène. Avec la souche *K. pneumoniae* 52.145, une expérience de précipitation de ligands potentiellement présents dans des extraits macrophagiques (pulldown) a montré que la protéine bactérienne VgrG, qui possède une extension C terminale (VgrG4-CTD), induit un remodelage de l'actine (do Nascimento Soares *et al.*, 2022). La même équipe a décrit une cascade de signalisation jusqu'alors inconnue ciblant les mitochondries et exploitée par le pathogène pour échapper aux réponses innées (Sá-Pessoa *et al.*, 2023). De plus, une étude très récente utilisant une méthode originale d'étude des interactions bactérie - cellule immunitaire unique (Bac-CyTOF : Bactérie-Cytométrie de Masse) a montré que le SST6 de *K. pneumoniae* contribue à façonner le paysage immunitaire pulmonaire en interagissant avec les macrophages alvéolaires (Calderon-Gonzalez *et al.*, 2024).

Pour comprendre les mécanismes d'action impliqués au niveau intestinal, il sera nécessaire dans un premier temps d'évaluer le rôle des SST6 de souches classiques sur les macrophages : participent-ils à un échappement phagolysosomal de la bactérie ou encore à une polarisation spécialisée de la cellule ? En effet, les effecteurs des SST6 de *K. pneumoniae* pourraient soit inhiber l'activité antibactérienne, soit moduler les voies de signalisation cellulaire découlant de l'activation des macrophages. Je propose donc de tester la capacité des effecteurs des T6SSs de *K. pneumoniae* (surproduits par clonage chez *E. coli* K12) à induire un changement phénotypique des macrophages humains (RAW-1) par mesure de la libération de cytokines pro-inflammatoires (TNF-alpha, IL-6, et/ou IL12p70) et/ou de l'expression des marqueurs CD80 et CD163, respectivement décrits comme des marqueurs de polarité M1 et de polarité M2. Enfin, l'utilisation d'une toxine dépendante de SST6 par la bactérie *K. pneumoniae*

pourrait créer une brèche dans la barrière formée par les cellules épithéliales intestinales et ce indirectement, en ciblant les macrophages résidents. Ainsi, des modèles d'interactions multicellulaires seront mis en place, impliquant notamment la coculture de macrophages (RAW 264.7) produisant Gas6 et de cellules épithéliales intestinales Caco-2 (Tsugawa *et al.*, 2023).

Ce travail original de culture de cellules en flux est en cours au laboratoire dans le cadre des travaux de recherche de Ola Habanjar (ATER) et en collaboration avec le Dr. Marjolaine Vareille-Delarbre Immunologiste (MCU Immunologie, LMGE CMES) et le Dr. Damien Balestrino (MCU biologie cellulaire, LMGE CMES). Une demande de financement EMERGENCE, I-SITE Clermont, a été déposée.

L'étude de l'interaction directe bactéries /cellules fournira de nouvelles informations sur l'étape initiale du processus physiopathologique des infections par *K. pneumoniae*, à savoir la colonisation intestinale par *K. pneumoniae*, qui précède la survenue d'une bactériémie ou d'une infection respiratoire, et sur l'implication des SST6 dans la dérégulation de voies cellulaires spécifiques. Cependant, les modèles *in vitro*, avec tous leurs avantages (éthique, reproductibilité) ne peuvent pas mimer totalement le dialogue tripartite microbiote, hôte et pathogène. Aussi, il est nécessaire d'adapter les modèles animaux afin de reproduire au mieux la physiopathologie des infections pour comprendre l'étape de colonisation intestinale à l'origine d'infections disséminées, avec comme objectif à long terme le développement de stratégies permettant de limiter cette étape.

2.3. Modèles murins de colonisation intestinale mimant le contexte physiopathologique des patients atteints d'infection à *K. pneumoniae*

a. Impact du T6SS de *K. pneumoniae* vis-à-vis des bactéries commensales participant à la résistance à la colonisation

Lors de travaux antérieurs, j'ai utilisé un modèle murin avec traitement antibiotique pour réduire la résistance à la colonisation du microbiote résident afin d'établir une colonisation intestinale pérenne par *K. pneumoniae* (Merciecca *et al.*, 2022). Si cette approche a permis de mettre en évidence le rôle du SST6 de *K. pneumoniae* dans l'établissement d'une dysbiose

intestinale, elle limite le champ d'investigation des facteurs bactériens propres à *K. pneumoniae* qui permettent de surmonter la résistance à la colonisation dans un contexte de compétition. Dans la littérature, plusieurs modèles de colonisation intestinale par des souches classiques de *K. pneumoniae* sans traitement antibiotique préalable sont décrits. Ils reposent soit sur une déstabilisation du système immunitaire (injection de liposomes de clodronate, conduisant à une déplétion des macrophages par induction de l'apoptose) (Sequeira *et al.*, 2020), soit sur une colonisation préalable de la cavité buccale par *K. pneumoniae* (Young *et al.*, 2020) validant le caractère opportuniste de l'infection et la transmission fécale-orale du pathogène. Nous reproduirons ces modèles afin, dans un premier temps, de valider les cibles des SST6 de *K. pneumoniae in vivo*, voire d'identifier de nouvelles cibles parmi les genres bactériens participant à la résistance à la colonisation exercée par le microbiote intestinal, comme *Bacteroidetes* (Sequeira *et al.*, 2020), (analyse 16S du microbiote intestinal). En effet, il a été mis en évidence qu'une souche hypervirulence Kp52145 peut antagoniser d'autres entérobactéries du microbiome intestinal d'une manière T6SS dépendante, et notamment d'autres espèces de *Klebsiella*, *K. variicola* et *K. oxytoca* (Calderon-Gonzalez *et al.*, 2023). Enfin, les méthodologies mises en œuvre dans cette partie pourront être appliquées à l'étude de l'impact des SST6 de *K. pneumoniae* sur le microbiote pulmonaire et plus largement sur l'impact de la colonisation intestinale dans l'hyper-inflammation pulmonaire. En effet, nous disposons au laboratoire d'un modèle d'infection pulmonaire par instillation intra-nasale et différents lots d'animaux pourront être testés et comparés (infectés par la souche CH1476 sauvage versus des mutants isogéniques invalidés pour les SST6, préalablement colonisés ou non au niveau intestinal). L'ensemble de ces données permettra d'élaborer une nouvelle vision de l'impact de *K. pneumoniae* dans son holobionte.

b. Rôles de l'alimentation dans la colonisation intestinale par *K. pneumoniae* ?

Développer des modèles plus proches de la physiopathologie des infections permettra de déterminer quels facteurs liés à l'hôte pourraient faciliter la colonisation de l'intestin et déclencher la dissémination de *K. pneumoniae*. Une étude très récente, réalisée avec des modèles murin et humain, a montré l'impact de l'ingestion de sucres simples et complexes, qui, en favorisant la croissance des commensaux concurrents dans le microbiote, limite la colonisation de *K. pneumoniae* (Hecht *et al.*, 2024). La dissémination systémique de *K.*

pneumoniae dans le modèle murin de colite chimique (DSS) peut également être limitée par une supplémentation en fibres alimentaires.

Une approche originale et complémentaire à ce travail consistera à faire varier le régime alimentaire d'animaux et à caractériser la première barrière protectrice du tractus : la couche de mucus. Le processus de translocation semble plutôt lié au caractère d'immunodépression du patient (Tsugawa *et al.*, 2023) mais les interactions de *Klebsiella* avec la couche de mucus n'ont pas encore été évaluées et elles pourraient jouer un rôle important. Les effets de l'alimentation sur cette couche peuvent être directs mais surtout indirects en influençant la composition du microbiote, via la prolifération sélective de certains membres (Suriano *et al.*, 2022) ; c'est le cas pour *K. oxytoca* vis-à-vis de *K. pneumoniae* (Osbelt *et al.*, 2021). De plus, la présence de fucose (composant terminal de la chaîne glycanique de la glycoprotéine intestinale Muc2) induit l'expression de l'opéron du métabolisme du fucose (*fuc*) de *K. pneumoniae*, ce qui favorise une colonisation intestinale robuste (Hudson *et al.*, 2022). Plusieurs phénotypes sont également associés au métabolisme du fucose chez *K. pneumoniae*, notamment l'hypermucoviscosité, l'auto-agrégation et la formation de biofilm, et l'ensemble de ces caractéristiques pourrait également favoriser le processus de colonisation. Cette régulation semble spécifique au genre *Klebsiella* chez les entérobactéries et non retrouvée chez des bactéries classiquement associées à une inflammation intestinale (*Salmonella*, *E. coli*) pour lesquelles le fucose réprime la formation de biofilm *in vivo* et soulage la colite expérimentale (Guo *et al.*, 2023). Faire varier les apports en sucres dans un modèle murin de colonisation intestinale par *K. pneumoniae* permettrait de connaître l'impact des apports alimentaires sur les caractéristiques de la couche de mucus (épaisseur, composition) et des cellules caliciformes. Dans cette approche, la dissémination bactérienne et la mesure de la perméabilité intestinale seront évaluées parallèlement, grâce à l'administration par gavage d'une molécule fluorescente (Dextran FITC) et à son suivi dans l'organisme.

Les connaissances ainsi générées apporteront des réponses aux questions sur les risques associés aux infections invasives de *K. pneumoniae* et notamment les facteurs alimentaires critiques pour la perpétuation de la dysbiose dans le microbiome. Enfin, les modèles murins mis en place constitueront une excellente plateforme pour évaluer l'efficacité de traitements visant à limiter voire éliminer la colonisation initiale asymptomatique de *K. pneumoniae*.

Le personnel supplémentaire nécessaire au déroulement du projet comprend un poste de doctorant de 3 ans (dépôt de sujet au concours de l'école doctorale SVSAE envisagé en 2025). De plus ce projet sera proposé à l'appel d'offre ANRS SAMS 2025.

Partie 3 : Limiter la colonisation intestinale : développer des stratégies prophylactiques et/ou thérapeutiques innovantes

L'identification de patients à risque d'infection à *Klebsiella* (*K. pneumoniae*, *K. variicola* et *K. quasipneumoniae*) est déjà proposée au travers d'un test rapide non invasif (écouvillons rectaux et PCR quantitative estimant la densité de colonisation par rapport au nombre total de copies d'ADN bactérien) (Sun *et al.*, n.d.). Limiter, voire réduire cette colonisation tout en préservant l'homéostasie du microbiote intestinal permettrait de réduire la dissémination ultérieure de *K. pneumoniae* dans l'organisme.

3.1. Stratégies ciblant le SST6

a. Immunisation ou blocage direct

Interférer avec le SST6 de *K. pneumoniae* pourrait préserver les capacités de résistance à la colonisation du microbiote résident, réduisant ainsi l'implantation initiale du pathogène. Différentes stratégies, plus ou moins conventionnelles par rapport aux données de la littérature, peuvent être envisagées.

L'inoculation de souches atténuées dans leur virulence pour prévenir l'infection par *K. pneumoniae*, sur le principe de la vaccination, représente une piste prophylactique prometteuse. Cependant, l'administration de mutants de *K. pneumoniae* délétés des opérons SST6 à des souris en même temps que la souche sauvage, n'affecte pas le degré de colonisation par la souche sauvage (données non publiées).

Une autre stratégie consisterait à inoculer des protéines recombinantes du SST6 pour activer de façon ciblée le système immunitaire afin qu'il interfère avec les souches de *K. pneumoniae* porteuses de SST6. Une telle approche prophylactique a déjà fait ses preuves *in vivo* en modèle murin : l'immunisation sous-cutanée de souris BALB/c par une protéine VgrG recombinante d'*A. baumannii*, entraîne la production d'IgG anti-VgrG. Cette immunisation augmente la survie, le score histologique tout en réduisant l'inflammation et la charge bactérienne dans les organes dans un modèle d'infection intrapéritonéale avec une dose létale de la souche sauvage *A. baumannii* ATCC 19606 (Alipouri *et al.*, 2022).

Enfin l'administration de xénobiotiques ciblant spécifiquement les SST6 constitue une alternative thérapeutique. Cherrak *et al.* ont développé un peptide cyclique biomimétique se

liant à TssK, qui bloque *in vitro* le recrutement de TssEFG et donc la formation de la plaque de base des souches d'*E. coli* entéroagrégatifs (EAEC), un processus essentiel dans la mise en place du SST6 (Cherrak *et al.*, 2021). Il serait intéressant de tester l'efficacité d'un tel peptide sur *K. pneumoniae*, initialement par des approches *in vitro* puis *in vivo* dans les modèles murins d'infection décrits précédemment. Cependant, si le SST6 représente une cible potentielle intéressante pour lutter contre des pathogènes, la présence de systèmes similaires dans des souches commensales voire bénéfiques est un obstacle majeur, en raison d'éventuels effets collatéraux.

b. Enrichissement du microbiote intestinal : attaquer ou résister ?

En modèle murin, via l'utilisation de son SST6, une souche commensale de *Bacteroides fragilis* contribue à la résistance à la colonisation intestinale vis-à-vis d'une souche pathogène homologue entérotoxigène (Hecht *et al.*, 2016). L'expression de gènes codant des SST6 par les bactéries commensales ciblant spécifiquement certains pathogènes pourrait protéger l'hôte de leur colonisation. Cependant, de telles stratégies bio thérapeutiques devraient tenir compte du mode d'action de chaque effecteur et de la sensibilité de la proie ciblée. Or, le genre *Klebsiella* semble protégé des attaques médiées par les SST6 via une barrière physique exercée par la présence de capsules notamment du groupe I (Flaughnatti *et al.*, 2021).

Le développement à plus long terme d'une stratégie basée sur l'enrichissement du microbiote intestinal par l'administration préalable ou simultanée de bactéries ciblées par les T6SSs de *K. pneumoniae* (identifiées dans la partie 1.2) est une perspective intéressante. Le genre *Faecalibacterium*, producteur de butyrate, un AGCC essentiel au maintien de l'homéostasie, représente un bon candidat pour le développement de produits biothérapeutiques vivants. Des expériences de compétition menées *in vitro* n'ont pas permis de mettre en évidence d'activité antibactérienne directe de *K. pneumoniae* envers la souche de référence *F. duncaniae* A2-165, vraisemblablement du fait de problèmes techniques (très grande sensibilité à l'oxygène). Mais l'acquisition récente d'équipements adéquats permettra de réaliser des investigations complémentaires pour tester l'activité antibactérienne de *K. pneumoniae* dans des conditions de culture particulières adaptées aux contraintes de chacune (anaérobiose stricte, P2) ou directement *in vivo*, en utilisant des modèles murins originaux décrits auparavant.

Conclusion

La réalisation de ce projet ambitieux repose sur la compréhension des mécanismes des processus physiopathologiques des infections dues à des souches classiques de *K. pneumoniae* impliquant les SST6. Les méthodologies proposées combinent des techniques maîtrisées au laboratoire (biologies moléculaire et cellulaire, microbiologie, manipulation de souris, imagerie en système cinétique) ou par des collaborateurs (analyse *in silico*, caractérisation de la réponse immunitaire, collection de bactéries bénéfiques) et des outils innovants. En résumé, altérer les T6SS des pathogènes représente une nouvelle stratégie pour limiter l'implantation de bactéries pathogènes opportunistes associées à un haut niveau de résistance aux antibiotiques dans le microbiote des patients. L'utilisation de bactéries bénéfiques comme leurres/compétiteurs ou bloqueurs de T6SS représente une alternative originale pour agir spécifiquement et sélectivement sur les pathogènes tout en préservant les membres commensaux du microbiote, et ainsi éviter le développement d'une infection. Les données générées au cours de ce projet constitueront des preuves de concept nécessaires au développement de stratégies innovantes.

La priorité est de fournir des réponses fondamentales pour concevoir des solutions applicables à un problème majeur de santé humaine dû aux infections liées aux soins à *K. pneumoniae*, avec des extensions potentielles à d'autres entérobactéries et notamment *E. coli*.

Références bibliographiques

- Adibi, S. A., and Mercer, D. W. (1973). Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal, and plasma amino acid concentrations after meals. *J. Clin. Invest.* 52, 1586–1594. doi: 10.1172/JCI107335
- 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. doi: 10.1186/s43141-022-00325-4
- Aranias, T., Grosfeld, A., Poitou, C., Omar, A. A., Le Gall, M., Miquel, S., *et al.* (2015). Lipid-rich diet enhances L-cell density in obese subjects and in mice through improved L-cell differentiation. *J. Nutr. Sci.* 4, e22. doi: 10.1017/jns.2015.11
- Aschtgen, M.-S., Bernard, C. S., De Bentzmann, S., Llobès, 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. doi: 10.1128/JB.00945-08
- Auger, S., Kropp, C., Borrás-Nogues, E., Chanput, W., Andre-Leroux, G., Gitton-Quent, O., *et al.* (2022). Intraspecific Diversity of Microbial Anti-Inflammatory Molecule (MAM) from *Faecalibacterium prausnitzii*. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 1705. doi: 10.3390/ijms23031705
- Barbosa, V. A. A., and Lery, L. M. S. (2019). Insights into *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system transcriptional regulation. *BMC Genomics* 20, 506. doi: 10.1186/s12864-019-5885-9
- Barnich, N., Boudeau, J., Claret, L., and Darfeuille-Michaud, A. (2003). Regulatory and functional cooperation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol. Microbiol.* 48, 781–794. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03468.x
- Benevides, L., Burman, S., Martin, R., Robert, V., Thomas, M., Miquel, S., *et al.* (2017). New Insights into the Diversity of the Genus *Faecalibacterium*. *Front. Microbiol.* 8, 1790. doi: 10.3389/fmicb.2017.01790
- Breyner, N. M., Michon, C., de Sousa, C. S., Vilas Boas, P. B., Chain, F., Azevedo, V. A., *et al.* (2017). Microbial Anti-Inflammatory Molecule (MAM) from *Faecalibacterium prausnitzii* Shows a Protective Effect on DNBS and DSS-Induced Colitis Model in Mice through Inhibition of NF- κ B Pathway. *Front. Microbiol.* 8, 114. doi: 10.3389/fmicb.2017.00114
- Brugiroux, S., Beutler, M., Pfann, C., Garzetti, D., Ruscheweyh, H.-J., Ring, D., *et al.* (2016). Genome-guided design of a defined mouse microbiota that confers colonization resistance against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Nat. Microbiol.* 2, 16215. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.215
- Calderon-Gonzalez, R., Dumigan, A., Sá-Pessoa, J., Kissenpfennig, A., and Bengoechea, J. A. (2024). In vivo single-cell high-dimensional mass cytometry analysis to track the interactions between *Klebsiella pneumoniae* and myeloid cells. *PLOS Pathog.* 20, e1011900. doi: 10.1371/journal.ppat.1011900
- Calderon-Gonzalez, R., Lee, A., Lopez-Campos, G., Hancock, S. J., Sa-Pessoa, J., Dumigan, A., *et al.* (2023). Modelling the Gastrointestinal Carriage of *Klebsiella pneumoniae* Infections. *mBio* 14, e0312122. doi: 10.1128/mbio.03121-22

- Cascales, E. (2008). The type VI secretion toolkit. *EMBO Rep.* 9, 735–741. doi: 10.1038/embor.2008.131
- Cesena, C., Morelli, L., Alander, M., Siljander, T., Tuomola, E., Salminen, S., *et al.* (2001). *Lactobacillus crispatus* and its nonaggregating mutant in human colonization trials. *J. Dairy Sci.* 84, 1001–1010. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74559-6
- Chassaing, B., and Cascales, E. (2018). Antibacterial Weapons: Targeted Destruction in the Microbiota. *Trends Microbiol.* doi: 10.1016/j.tim.2018.01.006
- Chen, H., Yang, D., Han, F., Tan, J., Zhang, L., Xiao, J., *et al.* (2017). The Bacterial T6SS Effector EvpP Prevents NLRP3 Inflammasome Activation by Inhibiting the Ca²⁺-Dependent MAPK-Jnk Pathway. *Cell Host Microbe* 21, 47–58. doi: 10.1016/j.chom.2016.12.004
- Cherrak, Y., Filella-Merce, I., Schmidt, V., Byrne, D., Sgoluppi, V., Chaiaheloudjou, R., *et al.* (2021). Inhibiting Type VI Secretion System Activity with a Biomimetic Peptide Designed To Target the Baseplate Wedge Complex. *mBio* 12, e0134821. doi: 10.1128/mBio.01348-21
- Claret, L., Miquel, S., Vieille, N., Ryjenkov, D. A., Gomelsky, M., and Darfeuille-Michaud, A. (2007). The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 282, 33275–33283. doi: 10.1074/jbc.M702800200
- Coudeyras, S., Jugie, G., Vermerie, M., and Forestier, C. (2008). Adhesion of human probiotic *Lactobacillus rhamnosus* to cervical and vaginal cells and interaction with vaginosis-associated pathogens. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2008, 549640. doi: 10.1155/2008/549640
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., *et al.* (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127, 412–421.
- Dausset, C., Bornes, S., Miquel, S., Kondjoyan, N., Angenieux, M., Nakusi, L., *et al.* (2020). Identification of sulfur components enhancing the anti-*Candida* effect of *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35. *Sci. Rep.* 10, 17074. doi: 10.1038/s41598-020-74027-7
- do Nascimento Soares, T., Silva Valadares, V., Cardoso Amorim, G., de Mattos Lacerda de Carvalho, M., Berrêdo-Pinho, M., Ceneviva Lacerda Almeida, F., *et al.* (2022). The C-terminal extension of VgrG4 from *Klebsiella pneumoniae* remodels host cell microfilaments. *Proteins* 90, 1655–1668. doi: 10.1002/prot.26344
- 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. *Microb. Pathog.* 169, 105668. doi: 10.1016/j.micpath.2022.105668
- Dreux, N., Denizot, J., Martinez-Medina, M., Mellmann, A., Billig, M., Kisiela, D., *et al.* (2013). Point mutations in FimH adhesin of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* enhance intestinal inflammatory response. *PLoS Pathog.* 9, e1003141. doi: 10.1371/journal.ppat.1003141

- Eshraghi, A., Kim, J., Walls, A. C., Ledvina, H. E., Miller, C. N., Ramsey, K. M., *et al.* (2016). Secreted Effectors Encoded within and outside of the *Francisella* Pathogenicity Island Promote Intramacrophage Growth. *Cell Host Microbe* 20, 573–583. doi: 10.1016/j.chom.2016.10.008
- Flaugnatti, N., Isaac, S., Lemos Rocha, L. F., Stutzmann, S., Rendueles, O., Stoudmann, C., *et al.* (2021). Human commensal gut Proteobacteria withstand type VI secretion attacks through immunity protein-independent mechanisms. *Nat. Commun.* 12, 5751. doi: 10.1038/s41467-021-26041-0
- Gallique, M., Decoin, V., Barbey, C., Rosay, T., Feuilloley, M. G. J., Orange, N., *et al.* (2017). Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 Type VI Secretion System to Biofilm Formation. *PloS One* 12, e0170770. doi: 10.1371/journal.pone.0170770
- Gorrie, C. L., Mirceta, M., Wick, R. R., Edwards, D. J., Thomson, N. R., Strugnell, R. A., *et al.* (2017). Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 65, 208–215. doi: 10.1093/cid/cix270
- Guilhen, C., Miquel, S., Charbonnel, N., Joseph, L., Carrier, G., Forestier, C., *et al.* (2019). Colonization and immune modulation properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilm-dispersed cells. *NPJ Biofilms Microbiomes* 5, 25. doi: 10.1038/s41522-019-0098-1
- Guo, X.-K., Wang, J., van Hensbergen, V. P., Liu, J., Xu, H., and Hu, X. (2023). Interactions between host and intestinal crypt-resided biofilms are controlled by epithelial fucosylation. *Cell Rep.* 42, 112754. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112754
- Hachani, A., Wood, T. E., and Filloux, A. (2016). Type VI secretion and anti-host effectors. *Curr. Opin. Microbiol.* 29, 81–93. doi: 10.1016/j.mib.2015.11.006
- 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. doi: 10.15252/embr.201642282
- Hecht, A. L., Harling, L. C., Friedman, E. S., Tanes, C., Lee, J., Firman, J., *et al.* (2024). Dietary carbohydrates regulate intestinal colonization and dissemination of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Clin. Invest.*, e174726. doi: 10.1172/JCI174726
- 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. doi: 10.1093/infdis/jiy534
- Hudson, A. W., Barnes, A. J., Bray, A. S., Ornelles, D. A., and Zafar, M. A. (2022). *Klebsiella pneumoniae* l-Fucose Metabolism Promotes Gastrointestinal Colonization and Modulates Its Virulence Determinants. *Infect. Immun.* 90, e0020622. doi: 10.1128/iai.00206-22
- 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. doi: 10.1016/j.chom.2014.04.010
- 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. doi: 10.3390/microorganisms9061282

- Journet, L., and Cascales, E. (2016). The Type VI Secretion System in *Escherichia coli* and Related Species. *EcoSal Plus* 7. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2015
- Jurénas, D., and Cascales, E. (2022). T6SS: killing two bugs with one stone. *Trends Microbiol.* 30, 1–2. doi: 10.1016/j.tim.2021.10.006
- Kaur, M., Miquel, S., Ollivier-Nakusi, L., Thorat, C., Varelle-Delarbre, M., Bekirian, C., *et al.* (2023). Elemental sulfur enhances the anti-fungal effect of *Lacticaseibacillus rhamnosus* Lcr35. *Microbes Infect.*, 105286. doi: 10.1016/j.micinf.2023.105286
- Lagrafeuille, R., Miquel, S., Balestrino, D., Varelle-Delarbre, M., Chain, F., Langella, P., *et al.* (2018). Opposing effect of *Lactobacillus* on in vitro *Klebsiella pneumoniae* in biofilm and in an in vivo intestinal colonisation model. *Benef. Microbes* 9, 87–100. doi: 10.3920/BM2017.0002
- Lange, K., Buerger, M., Stallmach, A., and Bruns, T. (2016). Effects of Antibiotics on Gut Microbiota. *Dig. Dis. Basel Switz.* 34, 260–268. doi: 10.1159/000443360
- Laval, L., Martin, R., Natividad, J. N., Chain, F., Miquel, S., Desclée de Maredsous, C., *et al.* (2015). *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 and the commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 exhibit similar protective effects to induced barrier hyper-permeability in mice. *Gut Microbes* 6, 1–9. doi: 10.4161/19490976.2014.990784
- 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. doi: 10.1073/pnas.2106555118
- Lenoir, M., Martín, R., Torres-Maravilla, E., Chadi, S., González-Dávila, P., Sokol, H., *et al.* (n.d.). Butyrate mediates anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii* in intestinal epithelial cells through Dact3. *Gut Microbes* 12, 1826748. doi: 10.1080/19490976.2020.1826748
- Lery, L. M. S., Frangeul, L., Tomas, A., Passet, V., Almeida, A. S., Bialek-Davenet, S., *et al.* (2014). Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* genomes identifies a phospholipase D family protein as a novel virulence factor. *BMC Biol.* 12, 41. doi: 10.1186/1741-7007-12-41
- Li, W., Liu, X., Tsui, W., Xu, A., Li, D., Zhang, X., *et al.* (2022). Identification and Comparative Genomic Analysis of Type VI Secretion Systems and Effectors in *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol.* 13, 853744. doi: 10.3389/fmicb.2022.853744
- Liu, L., Ye, M., Li, X., Li, J., Deng, Z., Yao, Y.-F., *et al.* (2017). Identification and Characterization of an Antibacterial Type VI Secretion System in the Carbapenem-Resistant Strain *Klebsiella pneumoniae* HS11286. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 442. doi: 10.3389/fcimb.2017.00442
- Liu, W., Li, M., Cao, S., Ishaq, H. M., Zhao, H., Yang, F., *et al.* (2023). The Biological and Regulatory Role of Type VI Secretion System of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Drug Resist.* 16, 6911–6922. doi: 10.2147/IDR.S426657
- Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., *et al.* (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55, 205–211. doi: 10.1136/gut.2005.073817

- Martín, R., Chain, F., Miquel, S., Lu, J., Gratadoux, J.-J., Sokol, H., *et al.* (2014a). The commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models. *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 417–430. doi: 10.1097/01.MIB.0000440815.76627.64
- Martín, R., Chain, F., Miquel, S., Motta, J.-P., Vergnolle, N., Sokol, H., *et al.* (2017a). Using murine colitis models to analyze probiotics-host interactions. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, S49–S70. doi: 10.1093/femsre/fux035
- Martín, R., Chain, F., Miquel, S., Natividad, J. M., Sokol, H., Verdu, E. F., *et al.* (2014b). Effects in the use of a genetically engineered strain of *Lactococcus lactis* delivering in situ IL-10 as a therapy to treat low-grade colon inflammation. *Hum. Vaccines Immunother.* 10, 1611–1621. doi: 10.4161/hv.28549
- Martin, R. M., and Bachman, M. A. (2018). Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 4. doi: 10.3389/fcimb.2018.00004
- Martín, R., Miquel, S., Benevides, L., Bridonneau, C., Robert, V., Hudault, S., *et al.* (2017b). Functional Characterization of Novel *Faecalibacterium prausnitzii* Strains Isolated from Healthy Volunteers: A Step Forward in the Use of *F. prausnitzii* as a Next-Generation Probiotic. *Front. Microbiol.* 8, 1226. doi: 10.3389/fmicb.2017.01226
- Martín, R., Miquel, S., Chain, F., Natividad, J. M., Jury, J., Lu, J., *et al.* (2015). *Faecalibacterium prausnitzii* prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model. *BMC Microbiol.* 15, 67. doi: 10.1186/s12866-015-0400-1
- Martín, R., Miquel, S., Langella, P., and Bermúdez-Humarán, L. G. (2014c). The role of metagenomics in understanding the human microbiome in health and disease. *Virulence* 5, 413–423. doi: 10.4161/viru.27864
- Martín, R., Miquel, S., Ulmer, J., Kechaou, N., Langella, P., and Bermúdez-Humarán, L. G. (2013). Role of commensal and probiotic bacteria in human health: a focus on inflammatory bowel disease. *Microb. Cell Factories* 12, 71. doi: 10.1186/1475-2859-12-71
- Martín, R., Miquel, S., Ulmer, J., Langella, P., and Bermúdez-Humarán, L. G. (2014d). Gut ecosystem: how microbes help us. *Benef. Microbes* 5, 219–233. doi: 10.3920/BM2013.0057
- Menezes-Garcia, Z., Kumar, A., Zhu, W., Winter, S. E., and Sperandio, V. (2020). l-Arginine sensing regulates virulence gene expression and disease progression in enteric pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 12387–12393. doi: 10.1073/pnas.1919683117
- Merciecca, T., Bornes, S., Nakusi, L., Theil, S., Rendueles, O., Forestier, C., *et al.* (2022). Role of *Klebsiella pneumoniae* Type VI secretion system (T6SS) in long-term gastrointestinal colonization. *Sci. Rep.* 12, 16968. doi: 10.1038/s41598-022-21396-w
- Miquel, S., Beaumont, M., Martín, R., Langella, P., Braesco, V., and Thomas, M. (2015a). A proposed framework for an appropriate evaluation scheme for microorganisms as novel foods with a health claim in Europe. *Microb. Cell Factories* 14, 48. doi: 10.1186/s12934-015-0229-1
- Miquel, S., Claret, L., Bonnet, R., Dorboz, I., Barnich, N., and Darfeuille-Michaud, A. (2010a). Role of decreased levels of Fis histone-like protein in Crohn's disease-associated adherent invasive *Escherichia*

- coli* LF82 bacteria interacting with intestinal epithelial cells. *J. Bacteriol.* 192, 1832–1843. doi: 10.1128/JB.01679-09
- Miquel, S., Lagrèfeuille, R., Souweine, B., and Forestier, C. (2016a). Anti-biofilm Activity as a Health Issue. *Front. Microbiol.* 7, 592. doi: 10.3389/fmicb.2016.00592
- Miquel, S., Leclerc, M., Martin, R., Chain, F., Lenoir, M., Raguideau, S., *et al.* (2015b). Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii*. *mBio* 6. doi: 10.1128/mBio.00300-15
- Miquel, S., Martín, R., Bridonneau, C., Robert, V., Sokol, H., Bermúdez-Humarán, L. G., *et al.* (2014). Ecology and metabolism of the beneficial intestinal commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii*. *Gut Microbes* 5, 146–151. doi: 10.4161/gmic.27651
- Miquel, S., Martín, R., Lashermes, A., Gillet, M., Meleine, M., Gelot, A., *et al.* (2016b). Anti-nociceptive effect of *Faecalibacterium prausnitzii* in non-inflammatory IBS-like models. *Sci. Rep.* 6, 19399. doi: 10.1038/srep19399
- Miquel, S., Martín, R., Rossi, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Chatel, J. M., Sokol, H., *et al.* (2013). *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 255–261. doi: 10.1016/j.mib.2013.06.003
- Miquel, S., Peyretailade, E., Claret, L., de Vallée, A., Dossat, C., Vacherie, B., *et al.* (2010b). Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PLoS One* 5. doi: 10.1371/journal.pone.0012714
- Miquel, S., Verlaguet, J., Garcin, S., Bertran, T., Evrard, B., Forestier, C., *et al.* (2022). *Lactocaseibacillus rhamnosus* Lcr35 Stimulates Epithelial Vaginal Defenses upon Gardnerella vaginalis Infection. *Infect. Immun.* 90, e00309-22. doi: 10.1128/iai.00309-22
- Motta, J.-P., Wallace, J. L., Buret, A. G., Deraison, C., and Vergnolle, N. (2021). Gastrointestinal biofilms in health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 314–334. doi: 10.1038/s41575-020-00397-y
- Nivoliez, A., Camares, O., Paquet-Gachinat, M., Bornes, S., Forestier, C., and Veisseire, P. (2012). Influence of manufacturing processes on in vitro properties of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35®. *J. Biotechnol.* 160, 236–241. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.04.005
- Nivoliez, A., Veisseire, P., Alaterre, E., Dausset, C., Baptiste, F., Camarès, O., *et al.* (2015). Influence of manufacturing processes on cell surface properties of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35®. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 399–411. doi: 10.1007/s00253-014-6110-z
- Nucci, A., Rocha, E. P. C., and Rendueles, O. (2022). Adaptation to novel spatially-structured environments is driven by the capsule and alters virulence-associated traits. *Nat. Commun.* 13, 4751. doi: 10.1038/s41467-022-32504-9
- Osbelt, L., Wende, M., Almási, É., Derksen, E., Muthukumarasamy, U., Lesker, T. R., *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. doi: 10.1016/j.chom.2021.09.003

- Quévrain, E., Maubert, M. A., Michon, C., Chain, F., Marquant, R., Tailhades, J., *et al.* (2016). Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 65, 415–425. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307649
- 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 Rep.* 21, 3927–3940. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.020
- Russell, A. B., LeRoux, M., Hathazi, K., Agnello, D. M., Ishikawa, T., Wiggins, P. A., *et al.* (2013). Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature* 496, 508–512. doi: 10.1038/nature12074
- Sakamoto, M., Sakurai, N., Tanno, H., Iino, T., Ohkuma, M., and Endo, A. (2022). Genome-based, phenotypic and chemotaxonomic classification of *Faecalibacterium* strains: proposal of three novel species *Faecalibacterium duncaniae* sp. nov., *Faecalibacterium hattorii* sp. nov. and *Faecalibacterium gallinarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 72. doi: 10.1099/ijsem.0.005379
- Sana, T. G., Flaugnatti, N., Lugo, K. A., Lam, L. H., Jacobson, A., Baylot, V., *et al.* (2016). *Salmonella* Typhimurium utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E5044–E5051. doi: 10.1073/pnas.1608858113
- Sá-Pessoa, J., López-Montesino, S., Przybyszewska, K., Rodríguez-Escudero, I., Marshall, H., Ova, A., *et al.* (2023). A trans-kingdom T6SS effector induces the fragmentation of the mitochondrial network and activates innate immune receptor NLRX1 to promote infection. *Nat. Commun.* 14, 871. doi: 10.1038/s41467-023-36629-3
- Schwarz, S., West, T. E., Boyer, F., Chiang, W.-C., Carl, M. A., Hood, R. D., *et al.* (2010). Burkholderia type VI secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. *PLoS Pathog.* 6, e1001068. doi: 10.1371/journal.ppat.1001068
- Sequeira, R. P., McDonald, J. A. K., Marchesi, J. R., and Clarke, T. B. (2020). Commensal Bacteroidetes protect against *Klebsiella pneumoniae* colonization and transmission through IL-36 signalling. *Nat. Microbiol.* 5, 304–313. doi: 10.1038/s41564-019-0640-1
- Sevrin, G., Massier, S., Chassaing, B., Agus, A., Delmas, J., Denizot, J., *et al.* (2020). Adaptation of adherent-invasive *E. coli* to gut environment: Impact on flagellum expression and bacterial colonization ability. *Gut Microbes* 11, 364–380. doi: 10.1080/19490976.2017.1421886
- Singh, R. P., and Kumari, K. (2023). Bacterial type VI secretion system (T6SS): an evolved molecular weapon with diverse functionality. *Biotechnol. Lett.* 45, 309–331. doi: 10.1007/s10529-023-03354-2
- Sivignon, A., Bouckaert, J., Bernard, J., Guin, S. G., and Barnich, N. (2017). The potential of FimH as a novel therapeutic target for the treatment of Crohn's disease. *Expert Opin. Ther. Targets* 21, 837–847. doi: 10.1080/14728222.2017.1363184
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J.-J., *et al.* (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16731–16736. doi: 10.1073/pnas.0804812105

- 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* 13, e0308521. doi: 10.1128/mbio.03085-21
- Storey, D., McNally, A., Åstrand, M., Sa-Pessoa Graca Santos, J., Rodriguez-Escudero, I., Elmore, B., *et al.* (2020). *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system-mediated microbial competition is PhoPQ controlled and reactive oxygen species dependent. *PLoS Pathog.* 16, e1007969. doi: 10.1371/journal.ppat.1007969
- Sun, Y., Patel, A., SantaLucia, J., Roberts, E., Zhao, L., Kaye, K., *et al.* (n.d.). Measurement of *Klebsiella* Intestinal Colonization Density To Assess Infection Risk. *mSphere* 6, e00500-21. doi: 10.1128/mSphere.00500-21
- Suriano, F., Nyström, E. E. L., Sergi, D., and Gustafsson, J. K. (2022). Diet, microbiota, and the mucus layer: The guardians of our health. *Front. Immunol.* 13, 953196. doi: 10.3389/fimmu.2022.953196
- Tsugawa, H., Ohki, T., Tsubaki, S., Tanaka, R., Matsuzaki, J., Suzuki, H., *et al.* (2023). Gas6 ameliorates intestinal mucosal immunosenescence to prevent the translocation of a gut pathobiont, *Klebsiella pneumoniae*, to the liver. *PLoS Pathog.* 19, e1011139. doi: 10.1371/journal.ppat.1011139
- Van de Wiele, T., Van den Abbeele, P., Ossieur, W., Possemiers, S., and Marzorati, M. (2015). “The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®),” in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, eds. K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, *et al.* (Cham (CH): Springer). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500150/> (Accessed October 18, 2022).
- Vareille-Delarbre, M., Miquel, S., Garcin, S., Bertran, T., Balestrino, D., Evrard, B., *et al.* (2019). Immunomodulatory Effects of *Lactobacillus plantarum* on Inflammatory Response Induced by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 87. doi: 10.1128/IAI.00570-19
- Verstraeten, S., Layec, S., Auger, S., Juste, C., Henry, C., Charif, S., *et al.* (2024). *Faecalibacterium duncaniae* A2-165 regulates the expression of butyrate synthesis, ferrous iron uptake, and stress-response genes based on acetate consumption. *Sci. Rep.* 14, 987. doi: 10.1038/s41598-023-51059-3
- Wrzosek, L., Miquel, S., Noordine, M.-L., Bouet, S., Joncquel Chevalier-Curt, M., Robert, V., *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. doi: 10.1186/1741-7007-11-61
- Young, T. M., Bray, A. S., Nagpal, R. K., Caudell, D. L., Yadav, H., and Zafar, M. A. (2020). Animal Model To Study *Klebsiella pneumoniae* Gastrointestinal Colonization and Host-to-Host Transmission. *Infect. Immun.* 88, e00071-20. doi: 10.1128/IAI.00071-20
- 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. doi: 10.2147/IDR.S353858

Annexes

Annexe 1 : Role of *Klebsiella pneumoniae* Type VI secretion system (T6SS) in long-term gastrointestinal colonization

Annexe 2 : Within-host evolution of *Klebsiella pneumoniae* from intestinal carriage to bacteremia