

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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