

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ (ED 414)

Unité de recherche CNRS : Architecture et Réactivité de l'ARN (UPR 9002)
Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC), Strasbourg

THÈSE présentée par : **Lorine DEBANDE**

soutenue le : **20 décembre 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg en Sciences de la
vie et de la santé spécialité Microbiologie**

Contribution des SPATEs SigA et SepA dans la survie de *Shigella* dans le plasma

THÈSE dirigée par : DR. MARTEYN Benoît – Directeur de Recherche INSERM – IBMC – Université
de Strasbourg - Strasbourg

RAPPORTEUR

Dr. ROUMENINA Lubka – DR INSERM – Sorbonne
Université – Centre de Recherche des Cordeliers (Inserm
UMRS1138) – Paris

RAPPORTEUR

Dr. ROUSSEL Alain – DR CNRS – LISM - Marseille

EXAMINATEUR INTERNE

Dr. FERRANDON Dominique – DR CNRS – IBMC -
Strasbourg

EXAMINATEUR EXTERNE

Dr. GRASSART Alexandre – CR INSERM – Centre
d'infection et d'immunité de Lille – INSERM U1019 – Lille

DIRECTEUR DE THESE

Dr. MARTEYN Benoît – DR INSERM

« *Quand la vie Pic, les SigArettes SepA mal !* »

Sabbah. A. & Debande. L. 2021. *Spatoches*

Abstract Français

Les *Shigella* sont les agents pathogènes responsables de la shigellose, qui reste l'une des principales causes de diarrhée chez les enfants de moins de cinq ans dans les pays en voie de développement. La shigellose se caractérise par de la fièvre et se traduit par une diarrhée hémorragique ; dans les cas les plus graves, des bactériémies à *Shigella* sont induites. Ainsi, que ce soit au niveau local (côlon infecté) ou au niveau systémique (circulation sanguine), les *Shigella* sont exposées au sang. Les mécanismes qui permettent à ces bactéries de s'adapter et de survivre à l'exposition au plasma restent à ce jour méconnus et relativement peu étudiés au niveau moléculaire. Durant ma thèse, j'ai confirmé dans un modèle de shigellose chez le cobaye que des hémorragies locales étaient induites par *S. flexneri* 5a et *S. sonnei*. J'ai démontré que les *Shigella* atteignaient les vaisseaux sanguins (CD31+/CD34+) dans la muqueuse au cours des stades tardifs de l'infection et se disséminaient ensuite dans la circulation sanguine. Ces résultats ont confirmé l'exposition de *Shigella* aux composants plasmatiques au cours de son cycle de virulence, de la muqueuse colique hémorragique à la circulation sanguine. J'ai démontré que toutes les souches de *Shigella* testées survivaient à l'exposition au plasma *in vitro* et que les Protéases à Sérine AutoTransportées des Entérobactéries (SPATEs) sont essentielles à la dissémination de *Shigella* dans la muqueuse colique et dans la circulation sanguine. J'ai confirmé que les SPATEs sont exprimées et sécrétées dans les environnements peu oxygénés rencontrés par *Shigella* lors de son cycle de virulence. En utilisant des souches mutantes, j'ai également démontré que les SPATEs favorisaient la survie de *Shigella* dans le plasma, en clivant le composant 3 du complément (C3), entravant ainsi l'activation du système du complément. J'ai ainsi montré que la capacité de *Shigella* à survivre à l'exposition au plasma est un facteur clé de sa virulence, à la fois au sein des foyers primaires et au niveau systémique.

English Abstract

Shigella spp. are the causative agent of shigellosis, which remains one of the main causes of diarrhea in children under five in developing countries. Fever and hemorrhagic diarrhea characterize shigellosis; in the most severe cases, *Shigella* bacteremia is induced. So, whether locally (infected colon) or systemically (bloodstream), *Shigella* is exposed to blood. The mechanisms by which these bacteria adapt to and survive plasma exposure remain poorly understood and relatively unstudied at the molecular level. During my thesis, I confirmed in a guinea pig model of shigellosis that *S. flexneri* 5a and *S. sonnei* induced local hemorrhages. I demonstrated that *Shigella* reached the blood vessels (CD31+/CD34+) in the mucosa during the late stages of infection and then disseminated into the bloodstream. These results confirmed the exposure of *Shigella* to plasma components during its virulence cycle, from the hemorrhagic colonic mucosa to the bloodstream. I demonstrated that all *Shigella* strains tested survived exposure to plasma *in vitro*, and that Serine Proteases Autotransporter of Enterobacteriaceae (SPATEs) are essential for the dissemination of *Shigella* in the colonic mucosa and bloodstream. I confirmed that SPATEs are expressed and secreted in the low-oxygen environments encountered by *Shigella* during its virulence cycle. Using mutant strains, I also demonstrated that SPATEs promote *Shigella* survival in plasma, by cleaving complement component 3 (C3), thereby hindering activation of the complement system. I have thus shown that *Shigella*'s ability to survive exposure to plasma is a key factor in its virulence, both within primary foci and at systemic level.

Table des matières

Remerciements	7
Abréviations	11
Liste des figures	14
Introduction	16
I. <i>Shigella</i> : une entérobactérie pathogène humaine	18
1. Historique et caractéristiques de la bactérie	18
a. Le LPS et les différentes souches/sérotypes	19
b. Le génome de <i>Shigella</i> et sa proximité génomique avec <i>E. coli</i>	20
2. Les facteurs de virulence	22
a. Le plasmide de virulence et les autres plasmides	22
b. Les systèmes de sécrétion	24
i. T6SS	24
ii. T3SS	25
iii. T5SS	26
3. Les protéases à sérine autotransportées d'entérobactéries (SPATEs)	28
a. Les gènes	29
b. La structure et la sécrétion	29
c. La fonction / classification	31
d. La régulation de l'expression des SPATEs	32
e. Les SPATEs de <i>Shigella</i>	33
i. Pic	34
ii. SepA	35
iii. SigA	36
4. La pathogenèse	37
a. Résistance dans le tractus digestif	38
b. Compétition avec le microbiote intestinal	39
c. Passage du mucus	39
d. Invasion de la barrière épithéliale et dissémination	40
e. Formation de foyers hypoxiques d'infection et oxygénation	41
f. Passage de la barrière endothéliale des vaisseaux sanguins	43
II. Subversion de la réponse immunitaire par <i>Shigella</i> et passage dans le sang	45
1. La détection de <i>Shigella</i> par le système immunitaire et l'activation de la réponse immunitaire lors de l'infection	45
2. La capacité de <i>Shigella</i> à contrecarrer le système immunitaire de l'hôte	46
a. La balance de l'inflammation via le T3SS	46
b. La subversion de l'immunité indépendante du T3SS	47
3. L'inactivation du système du complément par les SPATEs	48
a. Le système du complément	48
b. Inactivation du système du complément par les SPATEs	50
4. Le passage de <i>Shigella</i> dans le sang et sa survie	52
III. La shigellose	53
1. Les manifestations cliniques	53
2. Les modes de transmission aux seins des populations	56

3. L'épidémiologie	56
4. Le diagnostic.....	57
5. Les traitements.....	59
6. La multirésistance aux antibiotiques.....	59
7. Les vaccins.....	61
8. Le modèle animal de la shigellose.....	62
9. La bactériémie	63
a. Une infection du sang.....	63
b. La bactériémie à <i>E. coli</i>	64
c. La bactériémie à <i>Shigella</i>	65
Objectifs de la thèse.....	71
Résultats.....	74
Article 1 : SPATEs promote the survival of <i>Shigella</i> to the plasma complement system upon hemorrhage and bacteremia.....	75
Introduction	76
Discussion	108
Résultats supplémentaires	116
Annexes	121
Review 1 : The selective advantage of facultative anaerobes relies on their unique ability to cope with changing oxygen levels during infection.	122
Introduction	123
Article 2 : <i>Escherichia coli</i> killing by epidemiologically successful sublineages of <i>Shigella sonnei</i> is mediated by colicins	132
Introduction	133
Bibliographie	147

Remerciements

Cher Benoit, un grand merci de m'avoir accueilli dans ton laboratoire et de m'avoir fait confiance tout au long de ces trois ans et demi de thèse. Merci d'avoir été mon directeur de thèse et de m'avoir fait découvrir le monde de *Shigella* et de la recherche. C'est déjà fini... mais je pars heureuse et fière du travail que nous avons accompli ensemble. Check 🍊

J'aimerais ensuite remercier les anciens doctorants de mon équipe qui m'ont formée. Merci à Louise pour toutes nos discussions et les moments passés ensemble, à Strasbourg ou à Köln, et je sais que ce n'est pas fini. Un grand merci à Antonin pour sa sagesse, sa patience et sa gentillesse. Et enfin, Matthieu, je te remercie de m'avoir initié au monde de la SPATE, mon dieu qu'est-ce-que j'ai souffert de la purif de SigA (un calvaire de 3 ans) !

Ma chère équipe du 343, vous allez sacrément me manquer. Mais ne soyez pas surpris quand vous verrez ma tête apparaître dans l'encadrement de la porte vous dire « COUCOUUUUUUUU ».

La première personne que je vais remercier, et sans doute sur laquelle je pourrais écrire une thèse entière pour raconter nos aventures, c'est mon bestie, mon binôme, Jamy. Mon cher ami Ahmad, que va-t-on devenir l'un sans l'autre ? Tu as sauvé ma thèse, tu as su me faire rire, me soutenir, m'aider, me consoler, m'écouter, m'aiguiller dans mes réflexions. Je n'aurais jamais rêvé mieux que de cette ambiance que nous avons créé au labo, avec tes mêmes incroyables que je n'oublierai jamais, nos dessins, nous en train de gossip toute la journée en pause ou au labo (et qui arrêtons de parler quand Béa rentre dans le labo, faisant mine de travailler). Tu as rendu mes journées meilleures et je ne te remercierai jamais assez pour ça. Je suis fière de nous et de ce que nous avons produit ensemble, et je suis honorée de t'avoir transmis le flambeau, parce que j'ai confiance en toi et je sais que tu vas faire honneur aux Spatoches ! Prends bien soin de toi, prend bien soin des Shishi, et si tu sens que le moral n'est pas là, écris moi et je viens manger avec toi ou je te fais un vocal « 0:02 FLOOOOOOOOOOREEEEEEE ? ».

Chère Tam, c'est ensuite toi que je remercie du fond du cœur. Tu as été une collègue en or, tu as toujours répondu présente à mes demandes quand j'avais besoin de toi. On a tellement ri, pendant nos pauses café-clope, dans le bureau, au labo, toi me racontant tes Western Blot. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite, et j'espère que tu vas sauver le monde avec les ARNm de Sep, PicA et Sig !!!! Ciao à d'main !

Dear Jurate, I'd like to thank you for all the moments we spent together in the lab, at the bar, or watching Eurovision on your sofa! In your way, you taught me about the research profession and made me think about the controls! Now that my thesis is finished, I will visit you in Lithuania, and we'll go mushrooming in the forest, and drink Cuba libre.

Marina, thank you for all the good times we've had together both in and out of the lab. Our hour-long discussions about life or science or PGF paper made my days better. I wish you all the happiness in the world! I'll visit you in the lab to turn your little octopus upside down, give

it a big smile, and stand next to you at the coffee machine to distract you from your experiments!

Julie, pépitas, bichette, mon p'tit loup, JUL, pourquoi est-ce que tu n'es pas arrivée plus tôt ? Tu as illuminé ces 4 derniers mois de ma thèse. J'ai l'impression que l'on se connaît depuis des années, j'ai tellement ri et ça ne va pas s'arrêter là crois moi. Je te souhaite tout le courage du monde pour aller infecter les vilaines black 6 avec la Shishi ! Je suis sûre que tu vas tout déchirer. Ta motivation à apprendre notre thématique est incroyable et grâce à ça tu vas aller loin ! Un jour tu arriveras à voir les puits des gels SDS-PAGE, j'ai confiance en toi, je sais que tu peux le faire ! Prends soin d'Ahmad pour moi et prends soin de toi !

Cher Richard Patryk (oui j'ai retenu que ton vrai prénom c'est celui-ci), cela a été un très grand plaisir d'interagir avec toi. J'ai adoré nos discussions scientifiques et sur mon avenir, merci pour tous tes conseils. Tu m'as permis a de nombreuses reprises de remettre en question mes expériences, maintenant je vois les choses différemment à l'avance ! Un énorme merci également pour ton aide pour toutes les analyses de spectrométrie de masse. J'espère qu'on se croiera un jour à la piscine !

Béatrice, nous n'avons pas eu beaucoup de temps pour travailler ensemble, mais du peu que nous avons fait ensemble j'ai adoré travailler avec toi. Ta gentillesse, ta bienveillance et ta capacité de relecture de ma thèse en si peu de temps sont les choses les plus importantes que je retiendrais de toi. Oui Ahmad et moi on a souvent fait des bêtises au labo, mais cela te faisait souvent sourire ou rire quand tu nous voyais, et c'est ça le principal. Je croise tous mes doigts pour que tu obtiennes ton ANR et qui sait, peut-être que l'on va travailler de nouveau ensemble les prochains mois ! Bon courage pour les vidéos sur pads de « 2-3 heures » (je suis désolée par avance).

J'aimerais également remercier les différents stagiaires que j'ai pu encadrer et côtoyer, ce fut une expérience tellement enrichissante, me confortant dans mon envie de faire de la formation. Un grand merci à Victoria qui m'a énormément aidée avec les pads et les Bradford, également Marie, Nathan et Vanessa (alias Vanoche, tu vas aller loin je le sais).

Magali, sans vous, ma thèse aurait été un calvaire. Merci déjà de m'avoir encadré durant mon stage de master, vous avez été un pilier pour moi à ce moment-là. Vous m'avez tellement aidé à prendre des décisions pour mon futur et nos discussions ont été pour moi source d'inspiration. Mille milliards de merci pour toutes ces expériences que l'on a faites ensemble pendant 1 an, les clonages de *sigA* (quel calvaire !) et puis les purif de SigA. Merci de m'avoir formé au métier de chercheur. Merci d'avoir jugé mon travail durant mon CST et d'avoir toujours été sincère avec moi tout au long de ces 3 ans et demi. Je suis tellement fière d'avoir pu travailler avec vous !

Un grand merci à la plateforme de spectrométrie de masse d'esplanade pour votre réactivité et votre accompagnement pour mon projet. Un grand merci à Lauriane pour ta disponibilité et ta patience.

Jean-Daniel, merci pour ton aide sur le développement du projet de quantif des bactéries. J'espère sincèrement que tu pourras trouver l'aide dont tu as besoin pour développer la microscopie sur les pathogènes à l'IBMC.

Un grand merci aux différents collaborateurs avec lesquels j'ai pu interagir durant ma thèse. Premièrement Mario Meza-Segura, l'expert des SPATEs de l'autre côté de l'océan, thanks for your advice and for sending me the pSigA3 plasmid. Un grand merci à Ana Milinski, Laurent Bianchetti et Annick Deaegere de l'IBMC pour leur expertise en biologie structurale et pour avoir produit la structure 3D prédictive de SigA. Je remercie également Christine Allmang de mon unité pour m'avoir aiguillée sur la RT-qPCR et Christopher Mueller pour m'avoir permis de tester de nombreux anticorps sur mes coupes de côlon de cobaye. Pour finir je souhaiterais remercier Christina Faherty, spécialiste des facteurs de virulence de *Shigella* pour son écoute, ses conseils au début de ma thèse ainsi que l'envoi d'une souche double mutante qui sera nécessaire à notre laboratoire pour approfondir la recherche sur les SPATEs.

Je remercie chaleureusement Pascale Romby, Anne Théobald, Laure Schaeffer, Agnès Gaudry et Guillaume Bec pour votre écoute lors de mon épisode compliqué au laboratoire avec la Shishi.

Un grand merci à tous les autres doctorants et post-doctorants de l'unité avec qui j'ai pu interagir de près ou de loin, pour nos discussions dans les couloirs ou au bar.

J'aimerais également remercier mon jury de thèse, Lubka Roumenina, Alain Roussel, Dominique Ferrandon et Alexandre Grassart d'avoir accepté d'évaluer mon travail et pour les futures discussions passionnantes que nous allons avoir ensemble le jour de ma soutenance.

Ensuite, je remercie toute ma famille, même à distance vous avez su m'épauler, me rassurer, me donner de la force, m'écouter, être là tout simplement. Merci petit cochon pour m'avoir soutenu notamment pendant la période COVID haha, merci maman d'avoir pris le temps de relire ma thèse et de m'avoir rassuré à chaque étape. Merci papa, de m'avoir soutenu et d'avoir tenté de comprendre ce sur quoi je travaille. Merci à Laurent de m'avoir rappelé que « c'est MA thèse ! ». Merci à tous mes grands-parents et ma grand-mamie d'avoir toujours eu les bons mots pour me rassurer, vous me manquez beaucoup. Je vous aime.

Lauriane, je voulais te remercier tout particulièrement. Je n'oublierai jamais les moments que nous avons vécus ensemble. Tu m'as toujours soutenu, aimé et montré à quel point je pouvais compter sur toi. J'ai tellement de bons souvenirs de nos voyages, nos randos, nos sorties, le Pérou, l'ascension du Machu Picchu, juste passer du temps avec toi à te regarder jouer à la play. Tu m'as accompagné durant cette thèse, jusqu'au point de me demander d'arrêter de parler de science haha 😂 Mille merci également à Bernadette, de m'avoir accueillie chez vous presque tous les dimanches comme une membre de votre famille. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail. Je vous souhaite le meilleur à toutes les deux pour la suite, en espérant que l'on se reverra.

Mes amis, Katya et Jerem, Maïa et Kéké, merci pour tous les moments que nous avons passés ensemble, les repas, les week ends, les discussions, les soirées jeux ou à regarder la télé, nos sorties. Juste merci d'être dans ma vie.

Und zum guten Schluss möchte ich der Person danken, die ich liebe, Lisa. Du hast mich getroffen, als es für mich während meiner Doktorarbeit am schwierigsten war, nämlich am Ende. Seit diesem Tag warst du immer für mich da, sogar mehr, als ich mir je hätte wünschen können. Du kümmerst dich um mich, du unterstützt mich, du bringst mich zum Lachen, du kannst mir zuhören und mich glücklich machen. Ich liebe dich so sehr, ich wünsche mir, dass unsere Geschichte so lange wie möglich weitergeht und ich hoffe, dass ich dir gerecht werden kann. Du bist meine Sonne ☀️, du bist mein Mond 🌙, du bist meine Sterne ✨, du bist mein ganzes Universum 💖. Ich liebe dich

Pour finir voici mon testament de fin de thèse :

Je lègue :

- Ma paillasse et mon pipetboy rose à Julie,
- Mon tabouret, ma P2, toutes mes solutions et mes échantillons à Ahmad,
- Mon tiroir du haut du congélo à Ahmad,
- Mon tiroir du bas du congélo à Julie,
- Mon bureau à qui le voudra,
- Mon M9 a Béa et Marina,
- Mon tiroir sous bureau à Ahmad,
- Mes pipettes à Marina pour la chambre anoxique,
- Toutes mes solutions de western blot à Tam et Ahmad,
- Mes boîtes de Western Blot à Tam, Vanessa, Ahmad et Julie,
- Mes cellules à Patryk et Ahmad,
- Mes protocoles à tout le monde,
- Tipousse à Tam,
- Et tous mes cahiers de labo à Benoit.

Abréviations

3D : Trois dimensions
aa : Acides aminés
AAT : Alpha-1 antitrypsine
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine diphosphate
Ag : Antigène
AP : Voie alternative (*Alternative pathway*)
ARN : Acide Ribo-Nucléique
AT : Auto-transporteur
ATP : Adénosine triphosphate
 β -domain : domaine β (β -barrel)
BCP : gélose lactosée au pourpre de bromocrésol
cAAT : *AAT C-terminal peptide*
CNF-1 : *Cytotoxic Necrotizing Factor-1*
CNR : Centre National de Référence
CP : Voie classique (*Classical pathway*)
CRP : *Cyclic AMP receptor protein*
C-term : C-terminal
DCs : Cellules dendritiques (*Dendritic cells*)
FNR : *Fumarate Nitrate reductase Regulator*
GC : Guanidine - Cytosine
h : heure
HUS : *Hemolytic Uremic Syndrome* (Syndrome hémolytique et urémique)
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukines
Ipa : *Invasion Plasmid Antigens*
kb : kilo paire de bases
kDa : kilo Daltons
kg : kilogramme
LBs : Lymphocytes B
LP : Voie des lectines (*Lectine pathway*)
LPS : Lipopolysaccharides
LTs : Lymphocytes T
MAC : Complexe d'attaque membranaire (*Membrane Attack Complex*)
MBL : *Mannose-Binding Lectin*
MDR/XDR : *Multidrug-resistant/Extensively drug-resistant*
mg : milligramme
ml : millilitre
mmHg : millimètre de mercure
MO : Micro-organismes
MSM : Hommes ayant des relations sexuelles avec des Hommes (*Men who have Sex with Men*)
NF : *Nuclear Factor* (Facteur nucléaire)

NK : *Natural Killers*
Nod : *Nucleotide oligomerization domain*
ns : non significatif
N-term : N-terminal
O₂ : Oxygène
OAg : Antigène-O (*O-antigen*)
Omp : *Outer Membrane Protein*
OMS : Organisation mondiale de la santé
pb : paires de bases
PAI : *Pathogenicity island* (Ilot de pathogénicité)
PAM : Peptides Anti-Microbiens
PAMP : *pathogen-associated molecular pattern*
pb : paire de bases
PED : Pays en développement
PGN : Peptidoglycane
Pi : Phosphate
Pic : *Protein involved in Intestinal Colonization*
PMSF : PhenylMethylSulfonyl Fluoride
PRR : *Pattern Recognition Receptors*
pO₂ : Pression partielle en oxygène
qPCR : *quantitative Polymerase Chain Reaction*
SepA : *Shigella Extracellular Protein*
SigA : *Shigella IgA-like homolog*
SPATEs : *Serine Protease Autotransporter of Enterobacteriaceae*
SRP : *Signal Recognition Particle*
Stx : Shiga-toxine
T3SS : Système de sécrétion de type III
T5SS : Système de sécrétion de type V
T6SS : Système de sécrétion de type VI
TDR : Test de Diagnostic Rapide
TGI : Tractus Gastro-Intestinal
TLRs : *Toll-like-receptors*
TNF : *Tumor Necrosis Factor*
TSB : *Trypton Soya Broth*
USA : *United States of America*
µg : microgramme
µm : micromètre

Micro-organismes

A. baumannii : *Acinetobacter baumannii*
APEC : *Avian pathogenic E. coli*
DAEC : *Diffuse Adhering E. coli*
E. coli : *Escherichia coli*
EAEC : *Enteraggregative E. coli*
EHEC : *Enterohemorrhagic E. coli*
EIEC : *Enteroinvasive E. coli*
EPEC : *Enteropathogenic E. coli*

ETEC : *Enterotoxigenic E. coli*
ExPEC : *Extraintestinal Pathogenic E. coli*
P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*
REPEC : *Rabbit enteropathogenic E. coli*
S. aureus : *Staphylococcus aureus*
S. boydii : *Shigella boydii*
S. dysenteriae : *Shigella dysenteriae*
S. flexneri : *Shigella flexneri*
S. pneumoniae : *Streptococcus pneumoniae*
S. sonnei : *Shigella sonnei*
STEC : *Stx-producing E. coli*
ST-EPEC : *heat-stable enterotoxin-producing E. coli*
UPEC : *Uropathogenic E. coli*
V. cholerae : *Vibrio cholerae*
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Acides aminés :

A : Alanine
D : Acide aspartique
G : Glycine
H : Histidine
I : Isoleucine
N : Asparagine
S : Sérine

Liste des figures

Figure 1 : Ratio de mortalité pour 100 000 enfants âgés de moins de 5 ans atteints de diarrhée....	17
Figure 2 : Mortalité dues à des diarrhées pour différents pathogènes connus.....	18
Figure 3 : Représentation schématique du LPS de <i>S. sonnei</i> , <i>S. flexneri</i> 2a, <i>S. flexneri</i> 5a, <i>S. dysenteriae</i> 1 et <i>S. boydii</i> 6.....	19
Figure 4 : Modèle hypothétique d'évolution entre les <i>E. coli</i> non invasifs, <i>Shigella</i> spp. et EIEC.....	21
Figure 5 : Les facteurs de virulence codés sur les PAIs du chromosome de <i>Shigella</i>	22
Figure 6 : Plasmides de virulence de <i>S. flexneri</i> 5a et <i>S. flexneri</i> 2a et carte schématique de l'organisation des gènes de la région « PAI-like » du pWR100 chez <i>S. flexneri</i>	23
Figure 7 : Représentation schématique du T6SS de <i>S. sonnei</i>	25
Figure 8 : Représentation schématique du T3SS de <i>Shigella</i>	26
Figure 9 : Représentation schématique de 3 types de T5SS (Type Va, Vb et Vc).....	27
Figure 10 : Représentation schématique des différents domaines des SPATEs et de la sécrétion de leur domaine passager.....	30
Figure 11 : Distribution et classification des SPATEs au sein des différents pathogènes.....	31
Figure 12 : Les différentes SPATEs retrouvées dans les souches de <i>Shigella</i> du laboratoire	34
Figure 13 : Structure tridimensionnelle du domaine passager et du domaine β de translocation de SepA	36
Figure 14 : Tableau récapitulatif des fonctions et de l'organisation structurale des SPATEs de <i>S. sonnei</i> , <i>S. flexneri</i> 2a et 5a.....	37
Figure 15 : Les grandes étapes de la colonisation du tractus gastro-intestinal par <i>Shigella</i>	38
Figure 16 : Représentation schématique des différents mécanismes développés par <i>Shigella</i> permettant l'invasion de la barrière épithéliale et la dissémination.....	41
Figure 17 : Induction d'une hypoxie infectieuse lors de l'infection par <i>Shigella</i>	42
Figure 18 : Les cobayes déficients en ascorbate sont sensibles à l'infection par <i>S. flexneri</i> 5a, lors d'une infection intra-rectale ou orale, sur des périodes prolongées.....	43
Figure 19 : Les trois voies du système du complément chez l'humain.....	49
Figure 20 : Représentation schématique du clivage de C3 en C3a et C3b par la C3-convertase.....	50

Figure 21 : Récapitulatif des cibles des SPATEs d'EHEC, UPEC et Shigella parmi les protéines du complément.....	51
Figure 22 : Imagerie au microscope à transmission de congestion, dilatation et dommages des structures circulatoires présentes dans l'intestin d'un patient atteint de shigellose.	54
Figure 23 : Composition du plasma humain.	55
Figure 24 : Les pathogènes multirésistants aux antibiotiques classés dans la liste des pathogènes prioritaires de l'OMS.	60
Figure 25 : Validation d'un modèle de cobaye carencé en ascorbate sensible à la shigellose.....	63
Figure 26 : Facteurs de virulence nécessaires à UPEC pour coloniser les vaisseaux sanguins, survivre et se disséminer dans la circulation sanguine.	65
Figure 27 : Répartition des souches isolées du sang chez des enfants de moins de 5 ans ayant une bactériémie au Kenya entre 1998 et 2002.	67
Figure 28 : Tableau récapitulatif des études de cas de bactériémie à Shigella entre 1978 et 2023..	70

Figures supplémentaires

Figure S1 : Effet du plasma pré-traité par les surnageants de <i>S. sonnei</i> , <i>S. flexneri</i> 5a et <i>S. flexneri</i> 5a Δ sepA sur la croissance d' <i>E. coli</i> K12.....	117
Figure S2 : Développement d'une méthode robuste de quantification de la confluence bactérienne.	118
Figure S3 : Épitope conservé dans le domaine passager de SigA, SepA et Pic.....	119
Figure S4 : Western blot de la cross réactivité des anticorps anti-SPATEs.	120

Introduction

La diarrhée est la seconde cause de mort chez les enfants de moins de 5 ans dans le monde (1) avec environ 520 000 morts en 2017 et 370 000 en 2019 (2, 3). Les pays les plus touchés se trouvent en Afrique Sub-Saharienne, Centrale et du Sud, en Inde, au Bangladesh et en Asie du Sud-Est (**Fig. 1**). Les diarrhées sont causées par des agents pathogènes bactériens, viraux ou parasitaires. En 2015 et 2016, la *Global Burden of Disease Study* a classé les rotavirus comme la première cause de mort par diarrhée suivie par les bactéries du genre *Shigella spp.* (**Fig. 2**) (4, 5).

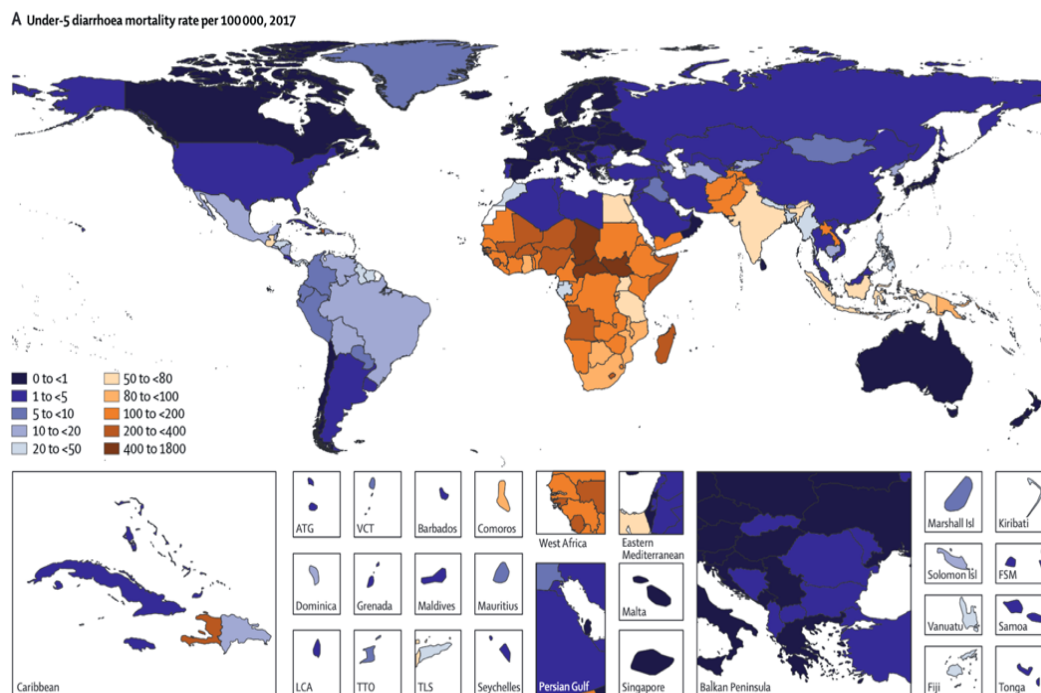


Figure 1 : Ratio de mortalité pour 100 000 enfants âgés de moins de 5 ans atteints de diarrhée (2). Les diarrhées touchent principalement l’Afrique Subsaharienne, centrale et du sud, l’Inde, le Bangladesh et l’Asie du Sud-Est.

La malnutrition, le manque d’hygiène, d’assainissement et d’accès à l’eau potable favorisent l’apparition des diarrhées dans les pays en voie de développement (PED) posant ainsi un problème majeur de santé publique. L’Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a donc mis en place des solutions de prévention comme le développement de l’accès à l’eau potable et d’installations sanitaires améliorées comme le traitement des eaux usées quasi inexistant dans les régions les plus touchées. Par ailleurs, la recherche scientifique a permis de développer des vaccins contre les rotavirus menant à une réduction considérable des maladies diarrhéiques et de la mortalité associée (6). Cependant, les bactéries du genre *Shigella spp.* restent des pathogènes pour lesquelles aucun vaccin commercialisé n’est encore

disponible, engendrant une mortalité élevée, notamment chez les nourrissons et les enfants en bas-âge.

	Morts dues à des diarrhées (en %)		
	Tous les âges	Enfant de moins de 5 ans	70 ans ou plus
Rotavirus	13,91%	28,78%	8,31%
<i>Shigella spp.</i>	12,85%	14,28%	10,73%
<i>Vibrio cholerae</i>	6,52%	11,71%	0,68%
Adenovirus	5,68%	11,78%	3,43%
Non-typhoidal <i>Salmonella spp.</i>	5,17%	8,38%	2,76%
<i>Campylobacter spp.</i>	4,58%	9,15%	2,50%
<i>Cryptosporidium spp.</i>	3,53%	10,83%	0,29%
Enterotoxigenic <i>E. coli</i>	3,10%	4,19%	2,61%
Amoebiasis	1,62%	1,02%	1,40%
<i>Clostridium difficile</i>	1,36%	0,44%	1,31%
Novovirus	1,19%	2,38%	0,54%
Aeromonas	1,02%	1,42%	1,14%
Enteropathogenic <i>E. coli</i>	0,76%	2,12%	0,21%

Figure 2 : Mortalité due à des diarrhées pour différents pathogènes connus. *Shigella spp.* est la deuxième cause de mortalité par diarrhée dans le monde après les rotavirus (5).

I. *Shigella* : une entérobactérie pathogène humaine

1. Historique et caractéristiques de la bactérie

Les bactéries du genre *Shigella* sont des bacilles non-motiles à coloration de Gram négative, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Il s'agit de bactéries pathogènes aéro-anaérobies facultatives non-sporulantes, colonisant spécifiquement la muqueuse colique de l'homme (aucun réservoir animal n'a été identifié à ce jour).

Shigella dysenteriae (*S. dysenteriae*) fut la première souche de *Shigella* à être découverte en 1898 par le médecin Japonais, Kiyoshi Shiga. Par la suite, en 1899, Simon Flexner isola 2 nouvelles souches qui sont aujourd'hui appelées *Shigella flexneri* (*S. flexneri*). C'est en 1903, que la Shiga-toxine (Stx) (étant seulement sécrétée par *S. dysenteriae* chez le genre *Shigella*) fut découverte par Conradi qui remarqua que l'injection d'extraits de culture du bacille dysentérique provoquait des effets neurotoxiques chez les lapins. En 1915, Carl Sonne isola

une souche fermentatrice de lactose (*S. dysenteriae* et *S. flexneri* étant des souches ne sachant pas fermenter le lactose), qui donnera naissance à *Shigella sonnei* (*S. sonnei*). C'est en 1931 que Boyd découvrit *Shigella boydii* (*S. boydii*).

Et c'est en 1950 seulement que *The Congress of the International Association of Microbiologists* choisit le terme « *Shigella* » comme nom générique et créa les 4 sous-groupes : sous-groupe A (*S. dysenteriae*), B (*S. flexneri*), C (*S. boydii*) et D (*S. sonnei*) (7).

a. Le LPS et les différentes souches/sérotypes

Il existe 4 sous-groupes de *Shigella* basés sur des caractéristiques biochimiques et sérologiques eux-mêmes subdivisés en plusieurs sérotypes selon la structure des répétitions de l'antigène-O (OAg) qui compose le lipopolysaccharide (LPS) de la paroi bactérienne (8) (**Fig. 3**).

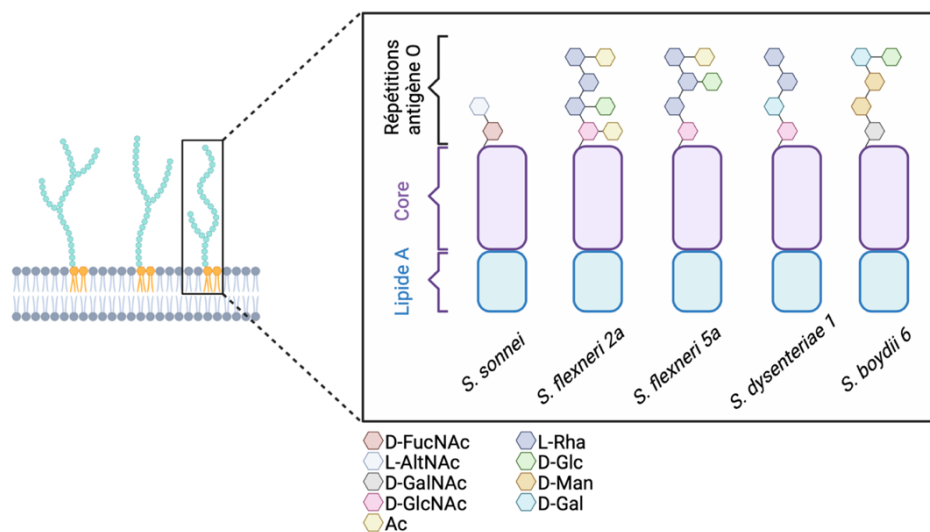


Figure 3 : Représentation schématique du LPS de *S. sonnei*, *S. flexneri* 2a, *S. flexneri* 5a, *S. dysenteriae* 1 et *S. boydii* 6. 2-Acetamido-4-amino-2, 4-dideoxy-D-fucose (D-FucNAc), 2-Acetamido-2-deoxy-L-altruronic acid (L-AltNAc), 2-Acetamido-2-deoxy-D-galacturoni galacturonic acid (D-GalNAc), 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucose (D-GlcNAc), L-Rhamnose (L-Rha), D-Glucose (D-Glc), D-Mannose (D-Man), D-Galactopyranose (D-Gal), O-acetyl (Ac) (Adaptée de (8, 9)).

Le LPS de *Shigella* (et plus généralement des bactéries à coloration de Gram négative), est composé de trois domaines reliés de façon covalente. Le lipide A (ou endotoxine) permet l'ancrage dans la membrane de la bactérie et est reconnu par le récepteur de surface TLR4 (*Toll-like-receptor 4*) et les récepteurs intracellulaires Nod (*Nucleotide oligomerization*

domain) des cellules lors de l'invasion par *Shigella* (10). La région « core » est assemblée par 2 répétitions de KDO (3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid), et d'une chaîne d'oligosaccharides (L-glycero-D-manno-heptose, glucose, galactose, glucosamine, 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucose par exemple). La composition de la chaîne de sucre de la région « core » varie entre les différentes espèces de *Shigella* et même parfois entre les différents sérotypes d'une même espèce (11). La partie la plus variable reste la partie de l'OAg qui est très différente selon les espèces et les sérotypes de *Shigella*, ce qui complexifie la fabrication d'un pan-vaccin à partir du LPS. Chez *S. sonnei*, on retrouve par exemple n répétitions d'un résidu de 4-dideoxy-D-fucose relié à un résidu d'acide 2-Acetamido-2-deoxy-L-altruronic (**Fig. 3**). La structure de l'OAg de *S. flexneri* 2a est beaucoup plus complexe puisqu'elle est composée de n répétitions d'un résidu de 2-Acetamido-2-deoxy-D-glucose branché à un O-acetyl, puis trois L-Rhamnose dont un branché à un D-Glucose et un branché à un O-acetyl. Les variations de la composition et des répétitions d'oligosaccharides composant l'OAg permet ainsi de distinguer 15 sérotypes de *S. dysenteriae*, 19 sérotypes de *S. flexneri*, 19 sérotypes de *S. boydii*, et un seul sérotype de *S. sonnei* (12). Il a été démontré *in vitro* par purification du LPS des bactéries intra- et extracellulaires, que la composition du LPS peut être modifiée (du lipide A et de la région « core ») durant la prolifération de *Shigella* dans des cellules épithéliales HeLa afin d'échapper à la réponse inflammatoire et ainsi à son éradication (10). Cette observation confirme que le LPS est un composant essentiel à la bactérie notamment comme facteur de virulence. De plus, des travaux ont montré que certaines souches de *Shigella* et d'*Escherichia coli* (*E. coli*) partagent la même structure de leur LPS, ce qui rend difficile leur classification (13).

b. Le génome de *Shigella* et sa proximité génomique avec *E. coli*

Les espèces de *Shigella* possèdent un ADN chromosomique compris entre 4,3 (*S. dysenteriae*) et 4,9 (*S. sonnei*) millions de paires de bases (pb) avec plus de 97% de similarité au niveau de la séquence d'ADN comparé au génome d'*E. coli* K12 (4,6 millions pb). Avant les années 1970, *Shigella* et *E. coli* étaient « taxonomiquement indifférenciables » selon la communauté scientifique qui se basait sur des hybridations d'ADN (14). *E. coli* et *Shigella* font tous les deux partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Contrairement à la plupart des *E. coli*, les *Shigella* ne sont pas motiles en raison de la perte des gènes flagellaires (**Fig. 4**) et bénéficient d'une

certaine motilité intracellulaire basée sur l'exploitation et la manipulation du cytosquelette d'actine. La caractéristique principale des *Shigella* est l'acquisition d'un grand plasmide de virulence de 220 kb, le pINV (**Fig. 4**), qui code pour une centaine de gènes essentiels à la pathogénicité des *Shigella* et notamment les gènes codants pour les composants du système de sécrétion de type III (T3SS) et ses effecteurs (15, 16) (**Fig. 6**). Parmi les *E. coli* pathogènes, l'*enteroinvasive E. coli* (EIEC) est très similaire à *Shigella*, car il possède également le plasmide pINV et peut causer la dysenterie à une intensité réduite. Il a même été démontré par des analyses génomiques que le génome d'EIEC est plus proche de celui des *Shigella spp.* que des souches *E. coli* non pathogènes (17). Durant le processus d'évolution, *Shigella*, initialement extracellulaire devint un pathogène intracellulaire facultatif capable de coloniser les cellules épithéliales intestinales humaines. Aujourd'hui les relations phylogénétiques entre les *E. coli* pathogènes et non pathogènes et le genre *Shigella spp.* restent encore obscures. En effet, selon certains postulats, ces deux organismes appartiennent à des sous-groupes phylogénétiques différents (18–20), alors que d'autres les classent dans la même famille (21, 22).

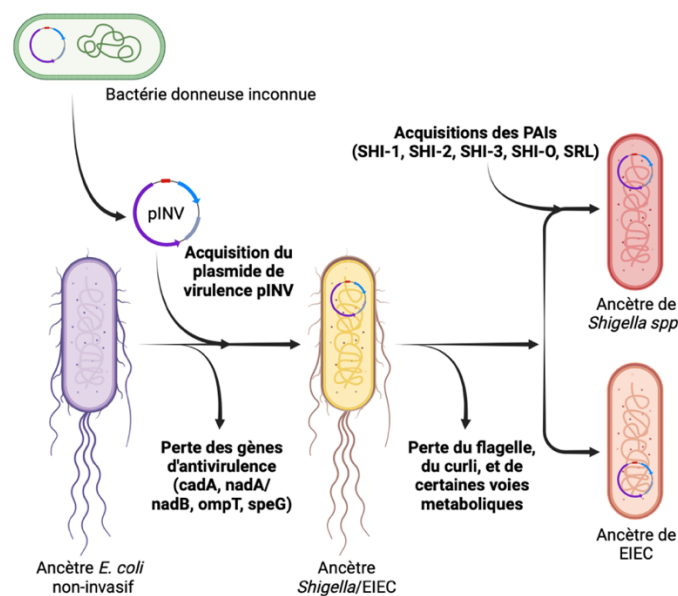


Figure 4 : Modèle hypothétique d'évolution entre les *E. coli* non invasifs, *Shigella spp.* et EIEC. Selon les modèles actuels, il semblerait que EIEC ne soit pas un ancêtre des espèces de *Shigella* mais plutôt que ces organismes auraient évolué parallèlement. Ils auraient tous deux acquis le pINV d'une souche commune ancestrale, perdu leur flagelle et certaines voies métaboliques. Les *Shigella* auraient alors acquis les îlots de pathogénicité SHI-1, SHI-2, SHI-3, SHI-O et SRL probablement par des transferts horizontaux de gènes. (Adapté du rapport d'Ahmad Sabbah et de (15)).

Des transferts de gènes ont également permis l'acquisition d'îlots de pathogénicité (PAIs) sur le pINV mais aussi sur le chromosome de *Shigella* (SHI-1, SHI-2, SHI-3, SHI-O et SRL) (Fig. 4), lui apportant des gènes codants pour des facteurs de virulence supplémentaires comme des toxines (*set1A*, *set1B*), des protéases (*sigA*, *pic*), des sidérophores (opéron *iuc*, *iutA*, opéron *fec*) ou encore des systèmes de résistance aux antibiotiques (opéron *tet*, *cat*, *oxa-1*, *aadA1*) (Fig. 5).

PAIs	Gènes	Fonction (s) de virulence
SHI-1	<i>sigA</i>	Accumulation de fluide intestinal, toxine cytopathique
	<i>pic</i>	Perméabilisation du mucus, résistance au sérum, hémagglutination
	<i>set1A</i> , <i>set1B</i>	Accumulation de fluide intestinal, développement de diarrhée liquide
SHI-2	<i>iucA</i> , <i>iucB</i> , <i>iucC</i> , <i>iucD</i> , <i>iutA</i>	Acquisition de fer
	<i>shiD</i>	Immunité des colicines I et V
	<i>shiA</i>	Dérégulation de l'inflammation par la suppression de la signation des cellules T
SHI-3	<i>iucA</i> , <i>iucB</i> , <i>iucC</i> , <i>iucD</i> , <i>iutA</i>	Acquisition de fer (chez <i>S. boydii</i>)
SHI-O	<i>gtrA</i> , <i>gtrB</i> , <i>gtrV</i>	Évasion de la réponse immunitaire de l'hôte
SRL	<i>fecA</i> , <i>fecB</i> , <i>fecC</i> , <i>fecD</i> , <i>fecE</i> , <i>fecl</i> , <i>fecR</i>	Acquisition de fer
	<i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetC</i> , <i>tetD</i> , <i>tetR</i>	Résistance à la tétracycline
	<i>cat</i>	Résistance au chloramphénicol
	<i>oxa-1</i>	Résistance à l'ampicilline
	<i>aadA1</i>	Résistance à la streptomycine

Figure 5 : Les facteurs de virulence codés sur les PAIs du chromosome de *Shigella* (15).

2. Les facteurs de virulence

a. Le plasmide de virulence et les autres plasmides

À l'ADN chromosomique s'ajoute le pINV, qui, selon les souches de *Shigella*, peut porter différents noms (par exemple pWR100 pour *S. flexneri* 5a et pSS120 pour *S. sonnei*). Il a été démontré en 1982 que le plasmide des espèces de *Shigella* encode et régule de nombreux effecteurs et fonctions, requis pour l'invasion des cellules épithéliales (16). Le séquençage du pWR100 de *S. flexneri* 5a a permis de mettre en évidence qu'une centaine de gènes sont présents sur ce plasmide de virulence (23). On retrouve une région « PAI-like » d'environ 31

kb qui comporte des gènes codant pour des composants du T3SS (*mxi-spa* opéron), des régulateurs du T3SS et du pINV (*virB* et *mxiE*), mais aussi des effecteurs du T3SS (opéron *ipaBCD*), et des protéines chaperons (*ipgA*, *ipgC*, *ipgE*, and *spa15*) (Fig. 6).

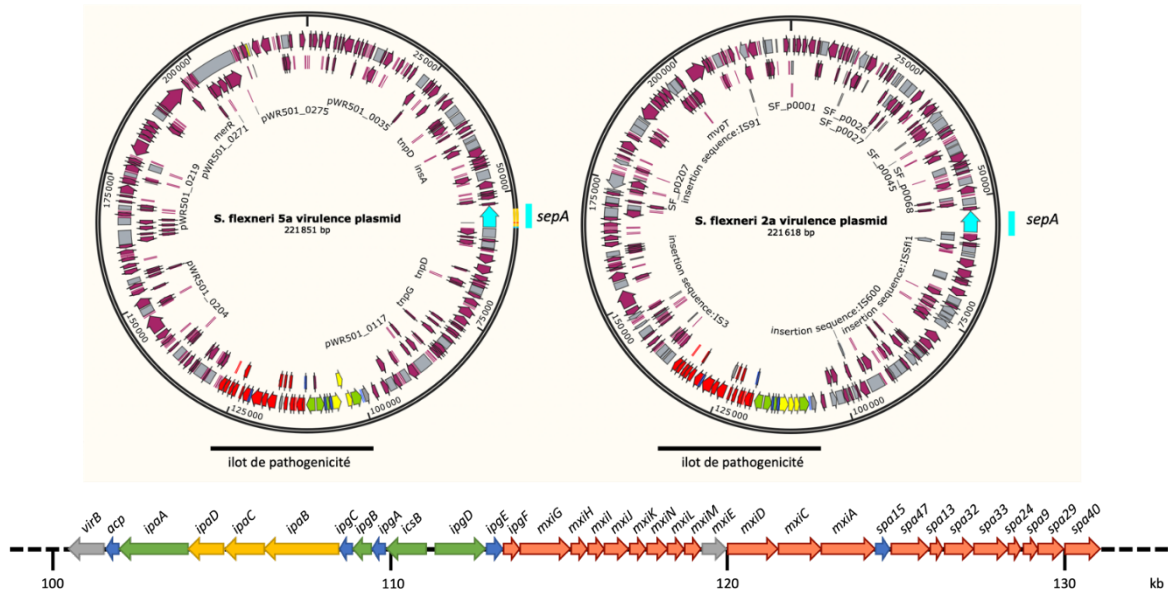


Figure 6 : Plasmides de virulence de *S. flexneri* 5a et *S. flexneri* 2a et carte schématique de l'organisation des gènes de la région « PAI-like » du pWR100 chez *S. flexneri*. Le gène *sepA* est représenté en bleu clair. En gris clair : régulateurs du T3SS et du pINV (et éléments d'insertions sur le plasmide), en bleu foncé : protéines chaperons, en vert : effecteurs du T3SS, en jaune : translocateurs du T3SS, en rouge : composants du T3SS, en violet : autres gènes (Adaptée de (15, 23)).

Par ailleurs, chez *S. flexneri*, on retrouve également sur le pWR100 le gène *sepA*, qui code pour une sérine protéase de la famille des *Serine Protease AutoTransporter of Enterobacteriaceae* (SPATEs). *sepA* se situe sur le pWR100 entre 54 et 58 kb chez *S. flexneri* 5a et 52 et 56 kb chez *S. flexneri* 2a (Fig. 6).

S. sonnei exprime et sécrète également des colicines qui sont encodées sur des plasmides pCol (ou *Col plasmids*). Chez les Entérobactéries, la taille de ces plasmides varie de 5 kb (*Col E1 plasmid*) à plus de 75 kb (*Col Ia plasmid*) (24). Les colicines sont des bactériocines qui permettent à *Shigella* d'entrer en compétition avec les bactéries du microbiote intestinal et de les éliminer. C'est ce que nous avons pu démontrer avec nos collaborateurs de l'Université de Liverpool ; *S. sonnei* tue *E. coli* en utilisant les colicines (voir Annexe, article 2, p. 132) (25).

b. Les systèmes de sécrétion

La virulence de *Shigella* est médiée par l'expression de 3 systèmes de sécrétion : le système de sécrétion de type III (T3SS), le système de sécrétion de type V (T5SS) et le système de sécrétion de type VI (T6SS). Ces machineries moléculaires membranaires, composées d'une ou de plusieurs protéines (jusqu'à plus de 20) permettent le transport d'effecteurs ou d'éléments toxiques dans le milieu extracellulaire ou directement dans une cellule hôte cible. Les protéines sécrétées peuvent promouvoir la virulence de la bactérie en favorisant l'attachement, agir comme toxine et impacter négativement les fonctions des cellules cibles, ou permettre à la bactérie l'acquisition d'éléments nécessaires à sa survie et sa dissémination au sein de l'hôte (26). Le T3SS de *Shigella* est l'appareil de sécrétion le mieux caractérisé à ce jour ; il est essentiel à l'invasion des cellules épithéliales du côlon. La contribution du T5SS est très peu décrite dans la littérature. Le T6SS quant à lui n'est présent que chez *S. sonnei* et sa fonction reste obscure.

i. T6SS

Le T6SS est un système de sécrétion bactérien permettant, par un contact cellule-cellule, d'injecter des protéines dans des cellules ciblées comme des cellules eucaryotes, mais également d'autres bactéries (26). Sa composition est bien connue chez *Shigella*. C'est un complexe membranaire composé d'une quinzaine de protéines (protéines TssABCEFGKJLM), qui atteindra la cellule cible grâce à l'expulsion d'une « seringue » (mécanisme nécessitant de l'ATP) composée des protéines HcpA, VGrG1 et RshD (**Fig. 7**). Il a été montré en 2017, qu'un isolat clinique de *S. sonnei* (CIP 106347) pouvait entrer en compétition avec *E. coli*, *in vitro*, mais également lors du processus d'infection chez les souris grâce à son T6SS (27). Cependant, dans notre article (voir Annexe, article 2, p. 132), le séquençage de cette souche clinique a montré que certains gènes essentiels au T6SS (notamment dans le gène *tssM* codant pour une protéine du complexe membranaire) ont été interrompus par l'insertion de séquences. De plus, 100% des isolats cliniques testés (ainsi que la souche CIP 106347) ne possèdent pas TssC, composant clé du système, suggérant que le T6SS dans ces isolats n'est pas fonctionnel. Les observations de compétition entre *S. sonnei* et *E. coli* précédemment faites ne seraient donc pas dues au T6SS (25). Il a été démontré chez d'autres micro-organismes, que le T6SS

permet la compétition avec des bactéries *in vitro* (*Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter rodentium*, *Acinetobacter baumannii*) (28).

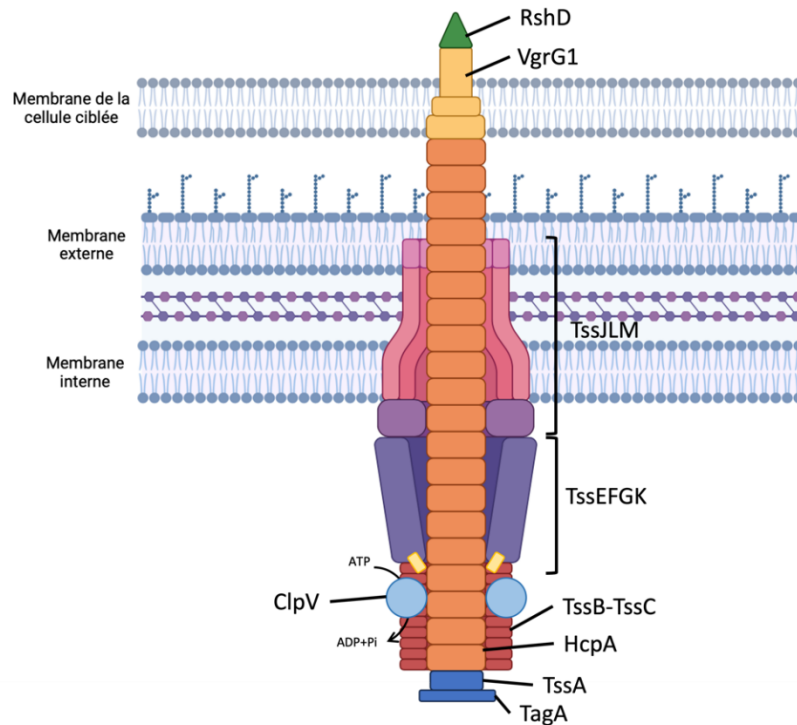


Figure 7 : Représentation schématique du T6SS de *S. sonnei*.

Si la fonction du T6SS de *Shigella* reste peu connue, celle du T3SS a été largement étudiée au cours des dernières décennies.

ii. T3SS

Le T3SS est un complexe membranaire composé d'une vingtaine de protéines. Il traverse les deux membranes de la paroi bactérienne et accède à la cellule cible grâce à une seringue qui délivre des effecteurs (**Fig. 8**). Les protéines mxi/spa sont impliquées dans la structure de la machinerie et dans son fonctionnement ATP-dépendant. Parmi de nombreux effecteurs identifiés, les protéines Ipa (*Invasion Plasmid Antigens*) (IpaA, B, C, D, IpaH7.8 et IpaH9.8) ont bien été caractérisées et sont essentielles à l'invasion des cellules épithéliales, à la lyse de la vacuole d'endocytose, à l'inhibition de l'apoptose ainsi qu'à la réplication intracellulaire de *Shigella* (15).

Comme vu précédemment, les gènes codants pour le T3SS sont présents sur le plasmide de virulence pINV. L'expression de ces gènes est régulée par des signaux environnementaux

comme la pression en oxygène (O₂) (29), ou la température (30, 31), provoquant l'activation ou l'inactivation du T3SS au cours du processus infectieux.

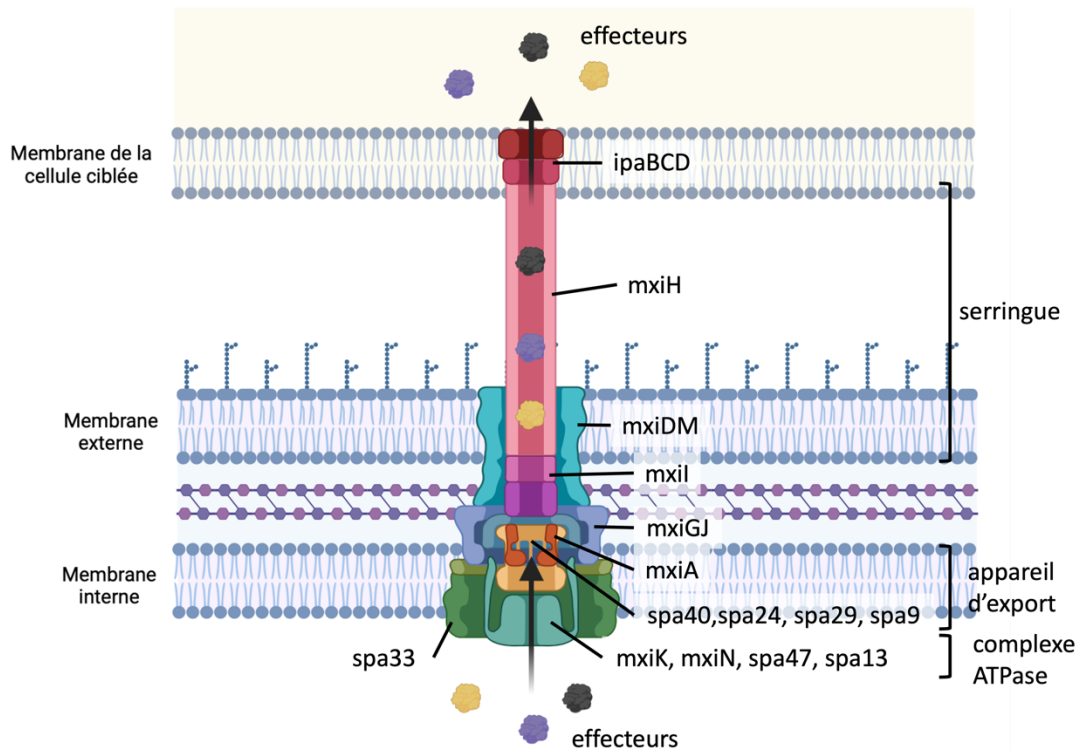


Figure 8 : Représentation schématique du T3SS de *Shigella*. (Adaptée de (9)).

Notre équipe a démontré *in vivo* en 2019 que le T3SS est actif en présence d'oxygène et inactif en absence d'oxygène ou dans des environnements où l'accès à celui-ci est réduit (32). De plus, une souche dépourvue de son pWR100 (souche *S. flexneri* 5a BS176) et donc de son T3SS, perd totalement son pouvoir d'invasion des cellules épithéliales (33).

En plus du T6SS et du T3SS, la virulence de *Shigella* repose aussi sur son T5SS.

iii. T5SS

Le T5SS est un système de sécrétion ou d'export de protéine à la membrane externe qui permet entre autres la sécrétion de facteurs de virulence hors de la bactérie. Ce système est retrouvé chez *E. coli*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas*, *Helicobacter pylori* (34). Il existe 6 grandes sous-classes de T5SS (Type Va-f) mais seulement 3 sont souvent retrouvées chez les bactéries à coloration de Gram négative. Il existe la voie de sécrétion des autotransporteurs (type Va ou AT-1), la voie de sécrétion de protéines à deux partenaires (type Vb) et la voie de type Vc ou AT-2 (**Fig. 9**). Ces protéines sont composées d'un

domaine transmembranaire qui s'ancre à la membrane externe de la bactérie permettant la translocation de la partie sécrétée dans le milieu extracellulaire. Ce système de sécrétion est dépendant du complexe de translocation Sec qui se trouve à la membrane interne de la bactérie. En effet, le transport de la protéine dépliée est initié au niveau de système Sec, permettant son passage dans le périplasma, où elle est prise en charge par des protéines chaperons et ensuite repliée pour être sécrétée au travers du domaine β (ou *beta barrel*) (Fig. 10).

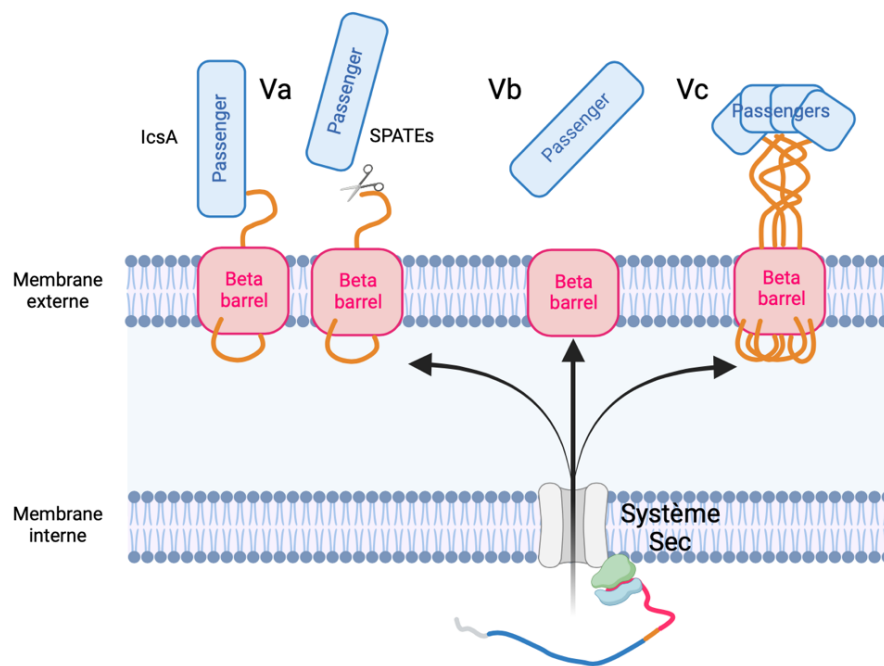


Figure 9 : Représentation schématique de 3 types de T5SS (Type Va, Vb et Vc). IcsA reste accroché à la membrane externe tandis que les SPATEs sont sécrétés dans le milieu extracellulaire.

Il existe aussi des facteurs de virulence de type Va ancrés à la membrane externe mais non sécrétés, comme la protéine IcsA qui est produite chez toutes les souches de *Shigella*. Il a été démontré que cette protéine joue un rôle dans la mobilité basée sur l'interaction avec le cytosquelette d'actine de la cellule hôte et dans l'échappement du mécanisme d'autophagie (35). Ce mécanisme de détournement du cytosquelette d'actine est appelé « *actin comet tail* ». En effet, dans le cytosol de la cellule, IcsA agit avec le régulateur N-WASP qui recrute Arp2/3 induisant finalement la polymérisation des filaments d'actine et la mobilité de la bactérie (36).

Il a également été décrit que le T5SS est impliqué dans le franchissement du mucus riche en peptides antimicrobiens (PAMs), notamment les SPATEs, appartenant au T5SS de type Va, pourraient y contribuer. Il a été montré que la protéine Pic, faisant parti de cette famille, produite chez les *E. coli* uropathogènes (UPEC), les *E. coli* enteroaggrégatives (EAEC) et chez *S. flexneri* 2a, possède une activité mucolytique (37). EspP, une SPATE d'*E. coli* entérohémorragique (EHEC) aurait quant à elle la propriété de dégrader les PAMs (38) et certaines protéines de l'immunité (39).

L'expression de ces différents systèmes de sécrétion permet ainsi à *Shigella* d'envahir et de se répliquer dans les cellules épithéliales, avant de se disséminer dans la muqueuse colique et de contrecarrer la réponse immunitaire de l'hôte.

3. Les protéases à sérine autotransportées d'entérobactéries (SPATEs)

Les SPATEs sont des protéases à sérine autotransportées à travers la paroi des entérobactéries et sécrétées dans le milieu extracellulaire. Elles appartiennent au T5SS de type Va (**Fig. 9**), sont décrites comme des auto-transporteurs (ATs) en raison de leur organisation structurale bien spécifique, et leur fonctionnement est apparentée à celles des trypsines (*trypsin-like family*). Cette famille de protéines est prévalente notamment chez les espèces de *Shigella* mais également chez les *E. coli* pathogènes (APEC, DAEC, EAEC, EHEC, EPEC, ETEC, REPEC, STEC, UPEC), *Salmonella*, *Edwardsiella* et *Citrobacter* (**Fig. 11**). Certaines SPATEs peuvent être présentes chez 2 espèces différentes comme Pic, SigA et SepA qui sont communes à *Shigella* et EAEC (40). Les SPATEs sont majoritairement décrites comme des facteurs de virulence (des toxines) qui sont les plus abondamment sécrétés chez *Shigella*. Elles peuvent dégrader un large panel de substrats cellulaires, être impliquées dans la modulation de l'immunité ou le réarrangement du cytosquelette. Malgré la conservation de la composition structurale des SPATEs entre les espèces, leurs fonctions et leurs spécificités de substrat semblent très différentes, les classant en 2 catégories : classe I et classe II, qui seront décrites page 31.

a. Les gènes

Les gènes codants pour les SPATEs de *Shigella* sont présents sur le plasmide de virulence pINV (*sepA*) ou sur le chromosome (*pic* et *sigA*). Selon N. Dautin le pourcentage de GC des gènes codants pour les SPATEs diffère significativement de celui des autres gènes des souches productrices, suggérant des transferts horizontaux de gènes durant l'évolution. Cette hypothèse est d'autant plus crédible que les gènes codants pour les SPATEs sont très souvent entourés par des éléments d'insertion, des intégrases ou des éléments mobiles (41). De plus, il existe une très forte identité de séquence entre les domaines β de translocation des SPATEs (de 74% à 76% d'identité entre SigA, SepA et Pic) tandis que les séquences des domaines sécrétés sont plus variables (de 51% à 57% d'identité entre SigA, SepA et Pic) (**Fig. S3**).

b. La structure et la sécrétion

Les SPATEs sont de grosses protéines composées de plus de 1000 acides aminés (aa) ; elles contiennent 4 domaines qui forment le précurseur : un peptide signal, un domaine *passenger* (sécrété), un domaine *linker* et un domaine β de translocation (*β -domain*) (**Fig. 10a**) (40). La partie mature de la protéine sera décrite ci-après.

Le premier domaine en N-terminal (N-term) est le peptide signal. Composé d'une cinquantaine d'acides aminés (aa) il permet l'adressage de la protéine à la membrane interne au niveau du système de translocation Sec via la protéine SRP (*Signal Recognition Particle*) ou via le système Sec dépendant de SecB (*SecB dependant pathway*). Dans le premier cas, la protéine, en cours de traduction, sera adressée au translocon Sec, traversera la membrane interne de la bactérie après clivage du peptide signal et sera relarguée, non repliée dans le périplasme (**Fig. 10b**). Dans le deuxième cas, la protéine SecB, en tant que chaperonne, viendra se fixer sur la protéine déjà traduite dans le cytoplasme pour lui permettre de garder une conformation optimale pour son passage à travers le translocon Sec. EspP et Pet (*E. coli*) sont adressés à la membrane interne grâce au mécanisme dépendant de SecB.

Une fois dans le périplasme, l'AT est protégé par des chaperonnes périplasmiques telles que Skp, SurA et DegP qui le maintiennent dans une conformation optimale pour la sécrétion.

La sécrétion se fait grâce au domaine β de translocation qui se trouve du côté C-terminal (C-term) de la protéine. C'est un domaine structuré de 277 aa composé de feuilletts β qui forment un « tonneau » dans la membrane externe de la bactérie. Ce domaine est très conservé au sein de la famille des SPATEs (de 60 à 99%). La protéine BamA, appartenant à la famille des

Omp85 (*outer membrane protein*), facilite le repliement et l'insertion du domaine β dans la membrane externe (42, 43).

Une fois le domaine β inséré dans la membrane externe, le domaine *passenger* replié est transloqué à travers la structure en tonneau et est sécrété dans le milieu extérieur grâce à une auto-protéolyse, au niveau du domaine *linker*, entre 2 asparagines (N/N) (**Fig. 10b**). Le domaine *passenger*, sera donc la seule partie de la protéine à être relarguée à l'extérieur de la bactérie (protéine « mature »). C'est un domaine de grande taille (plus de 100 kDa) portant le site actif qui est exposé à la surface de la protéine. Certaines structures cristallisées de SPATEs ont été résolues (SepA (voir **Fig. 13** p.36), EspP et Hbp) (44–46), et la plupart des autres structures 3D ont été prédites grâce à des logiciels en *open access* comme AlphaFold.

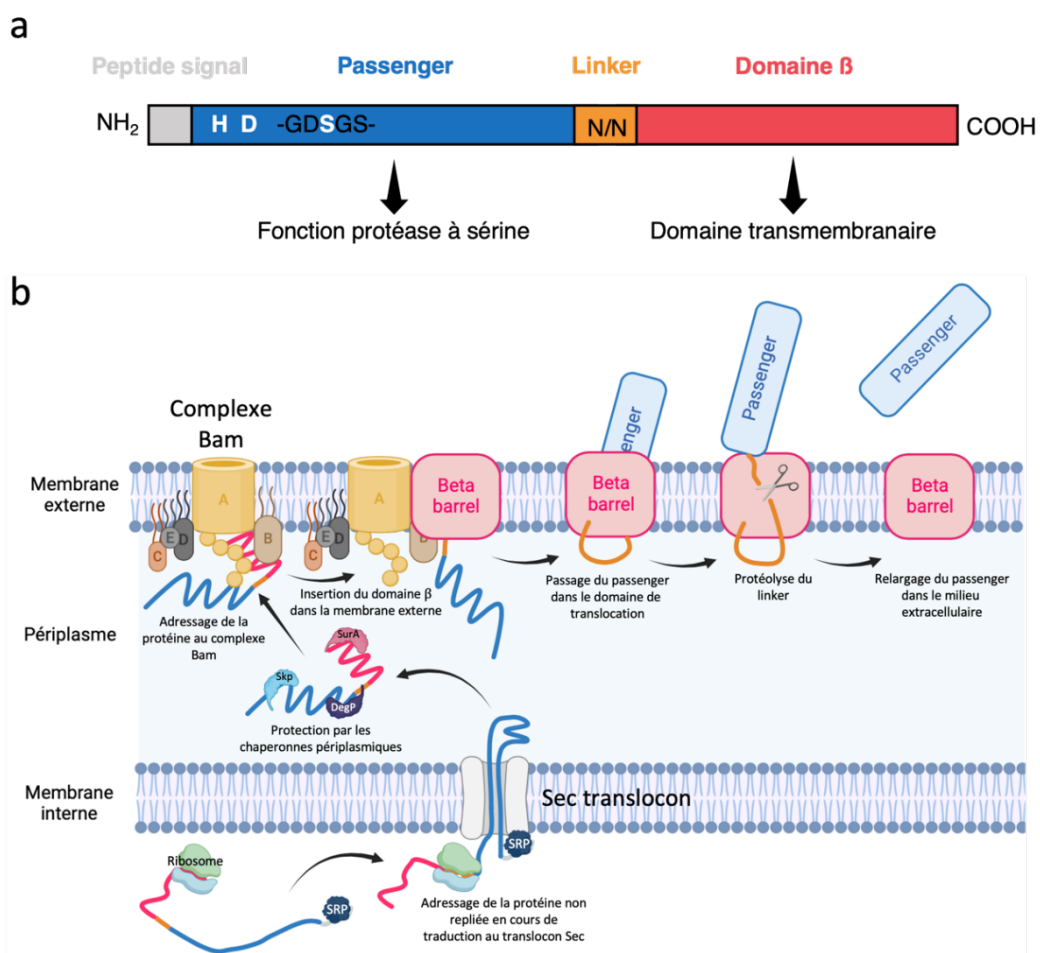


Figure 10 : Représentation schématique des différents domaines des SPATEs et de la sécrétion de leur domaine *passenger*. (a) Organisation structurale des SPATEs. (b) Mécanisme de sécrétion des SPATEs.

Une fois dans le milieu extracellulaire, les SPATEs, protéases à sérine (composées d'une triade catalytique), interagissent avec leurs cibles. Cette triade contient une sérine (S) (dite sérine catalytique), une histidine (H) et un acide aspartique (D). L'interaction entre ces 3 aa forme un relai de charge qui rend la sérine nucléophile. Cela permet la formation d'une nouvelle liaison avec l'atome de carbone de la liaison peptidique du substrat et entraîne l'hydrolyse de celle-ci (47). Le motif le plus conservé chez toutes les SPATEs (conservation de 100%) est le motif GDSGS (S étant la sérine catalytique). La mutation de la sérine catalytique de Pet (S260I) abolit sa fonction protéolytique, de la même façon que lors de l'ajout d'un inhibiteur de protéase à sérine comme le phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (48).

Les protéases à sérine autotransportées des entérobactéries ont été divisées phylogénétiquement en 2 catégories distinctes selon leur homologie de séquence et leur cytotoxicité.

c. La fonction / classification

Les SPATEs sont classées en 2 catégories (**Fig. 11**) selon la composition en aa de la séquence peptidique de leur domaine *passenger* et selon leur fonction (40). La classe I est composée de EspP, EspC, SigA, Pet, Sat, TagC et CrC1. La plupart des études sur les SPATEs de classe I font ressortir des effets cytotoxiques sur les cellules épithéliales en culture, des spécificités de substrats communes et des effets enterotoxiques sur les tissus de côlons. Les substrats décrits sont le facteur V de coagulation, l' α -spectrine, la pepsine ou la caséine (40, 42, 49).

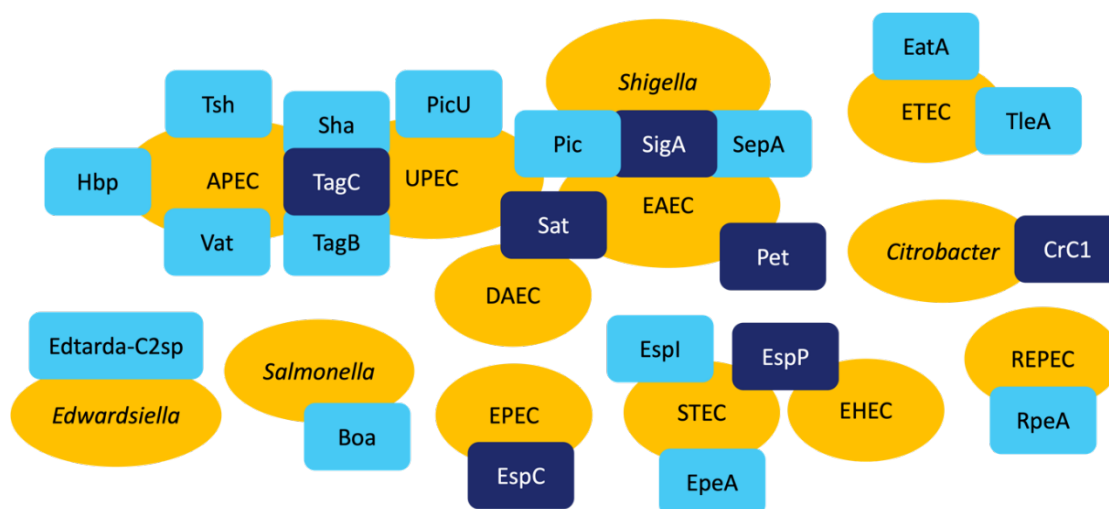


Figure 11 : Distribution et classification des SPATEs au sein des différents pathogènes. En bleu foncé : SPATEs de classe I, en bleu clair : SPATEs de classe II. Abréviations : APEC : *Avian*

pathogenic E. coli, DAEC : *Diffuse Adhering E. coli*, EAEC : *Enteroaggregative E.coli*, EHEC : *Enterohemorrhagic E. coli*, EPEC : *Enteropathogenic E. coli*, ETEC : *Enterotoxigenic E. coli*, REPEC : *Rabbit enteropathogenic E. coli*, STEC : *Stx-producing E. coli* et UPEC : *Uropathogenic E. coli*. (40–42, 49).

La classe II, quant à elle, regroupe des SPATEs qui ont une fonction immunomodulatrice et favorisent la colonisation de la muqueuse. Des activités mucinases sont majoritairement décrites ou des O-glycoprotéases qui dégradent les O-glycoprotéines à la surface des leucocytes. Cette famille est composée de Pic, SepA, Hbp, Tsh, Vat, Sha, TagB, PicU, Boa, RpeA, Espl, EpeA, TleA, EatA et Edtarda-C2sp.

d. La régulation de l'expression des SPATEs

Les mécanismes de régulation des SPATEs restent peu étudiés malgré l'avancée de la caractérisation de ces protéases. Il a été suggéré que l'expression des SPATEs soit régulée par les stimuli environnementaux comme la température, le pH, les niveaux d'oxygène, la composition du milieu, l'accès aux nutriments ou encore la densité bactérienne, dont quelques exemples sont présentés ci-après. En effet, lors de la colonisation de l'hôte par le pathogène, celui-ci doit sans cesse s'adapter aux variations environnementales. Il a été montré que certaines SPATEs (Pic, SigA, SepA, Tsh, EspP et EspC) sont sécrétées en plus grande quantité à 37°C, la température optimale du corps humain (comparé à 30 ou 42°C) ; on dit qu'elles sont thermorégulées (37, 42, 50–52). De plus, la sécrétion de Pic semble être régulée par le pH (optimal à 9.0) (37) tout comme EspP (optimal à 7.0-9.0) (50). Le milieu de culture permettant la sécrétion et la purification des SPATEs au laboratoire a aussi son importance, puisque la plupart des SPATEs sont optimalement produites dans un milieu riche comme le LB comparé à un milieu minimum M9 (41). Au laboratoire, un doctorant a montré que les SPATEs de *Shigella* sont également sécrétées dans des milieux de culture cellulaire (DMEM et RPMI) (données non publiées).

Il a été montré que la fonction du T3SS est régulée selon les taux d'oxygène dans le milieu environnant (29) mais rien n'est connu de ce mécanisme de régulation chez les SPATEs. (données présentées dans l'article 1, Fig. 2 p.95).

Par ailleurs, il a été montré chez EAEC que la production de Pic et Pet est stimulée lors d'une mise en contact de la bactérie avec des cellules épithéliales T84 polarisées de carcinome de côlon (53). Cette donnée a soulevé de l'intérêt, puisqu'à l'approche de la barrière épithéliale,

la bactérie va adapter la sécrétion de ses facteurs de virulence pour favoriser son invasion et les étapes suivantes de son cycle infectieux. Enfin, il a été mis en évidence chez EAEC et UPEC que les promoteurs des gènes *pet* et *pic* sont régulés par le facteur de transcription CRP (*cyclic AMP receptor protein*) et le facteur nucléaire Fis. Ces régulateurs jouent le rôle d'activateur/répresseur de la transcription en fonction de la disponibilité en nutriment (source de carbone) dans le milieu environnant (54).

Aucune étude de la régulation de la sécrétion des SPATEs par la densité bactérienne n'a été menée jusqu'à présent. Rappelons également que les SPATEs sont des sérines protéases sécrétées qui pourraient très bien s'autodégrader ou dégrader d'autres facteurs de virulence de la bactérie elle-même (comme des protéines membranaires, *IcsA* par exemple) ou des protéines de bactéries du microbiote. *EatA*, une SPATE d'ETEC (homologue de *SepA* chez *Shigella*), est capable de dégrader sa propre adhésine *EtpA* induisant une modulation de l'adhérence de la souche lors du processus infectieux (55). Il reste donc vraisemblablement des mécanismes à élucider qui permettraient à la bactérie de moduler la sécrétion de ses SPATEs en fonction des micro-organismes environnants ou de sa densité optique au niveau du site de l'infection.

e. Les SPATEs de *Shigella*

Toutes les espèces de *Shigella* expriment et sécrètent au moins une SPATE appartenant au T5SS de type Va (**Fig. 12**) (56). Chez *Shigella*, trois de ces protéases ont été identifiées : *Pic* (GenBank Accession No. AAK00464.1), *SepA* (GenBank Accession No. CAA88252.1) et *SigA* (GenBank Accession No. AAF67320.1). Certaines études ont également mis en évidence que *Sat* est une SPATE présente chez quelques souches de *Shigella*, notamment chez *S. flexneri* et *S. sonnei* (56–58). Cependant, dans nos souches de laboratoire, nous n'avons jamais identifié de *Sat* dans les analyses de sécrétomes. *Pic*, *SepA* et *SigA* étant conservées au sein du genre *Shigella* et immunogéniques, elles pourraient être utilisées comme cibles pour de potentiels pan-vaccins.

	<i>S. flexneri</i> 2a	<i>S. flexneri</i> 5a	<i>S. sonnei</i>
Pic			
SepA			
SigA			

Figure 12 : Les différentes SPATEs retrouvées dans les souches de *Shigella* du laboratoire.

Le vert signifie la présence de la SPATE dans le surnageant de la souche et le gris son absence (données non publiées obtenues par des analyses en spectrométrie de masse au laboratoire).

i. Pic

Pic (pour « *Protein involved in Intestinal Colonization* ») est une protéase à sérine de classe II dont le domaine *passenger* a un poids moléculaire de 109,8 kDa. Elle est sécrétée par *S. flexneri* 2a, mais également par EAEC et UPEC. Le gène codant pour Pic se trouve sur le chromosome de *S. flexneri* 2a et des fonctions diverses ont été décrites pour cette protéase mais aucune fonction cytotoxique. Il a été mis en évidence que Pic possède une activité de mucinase, c'est-à-dire qu'elle cible et dégrade les mucines présentes dans le mucus permettant une meilleure invasion de la barrière épithéliale et offrant des sources de nutriments à la bactérie (59, 60). Dans un modèle d'infection d'iléon de rat par *S. flexneri* 2a, Pic induit une hypersécrétion de mucus et une augmentation du nombre de cellules caliciformes (*goblet cells*) au sein des villosités, mécanisme indépendant de sa sérine catalytique (S258). Ces résultats expliquent la présence de mucus dans les selles des patients atteints de shigellose (diarrhées mucoïdes) (61). D'autres études ont montré que Pic se lie et clive les glycoprotéines riches en O-glycanes (CD43, CD44, CD45, CD93, CD162) à la surface des leucocytes ainsi que la fractaline, une chimiokine, conférant à la bactérie une capacité de modulation de l'immunité et de l'inflammation (62). Pic cible également certaines protéines du système du complément (C2, C3, C3b, C4, C4b, C5) (**Fig. 21**) (63) réduisant ainsi l'activation des 3 voies de ce système de l'immunité innée (**Fig. 19**) et permettant une résistance de *Shigella* à l'exposition au sérum, tout comme cela a été observé pour EspP (39) et Sat (64). Par ailleurs, Pic joue également un rôle d'hémagglutinine, capable de se lier aux érythrocytes du sang des rats, des cochons, des chevaux, des moutons, des lapins mais pas à ceux des humains (37), et clive le facteur V de coagulation.

ii. SepA

SepA (pour « *Shigella extracellular protein* ») est la seule SPATE de *Shigella* qui est encodée sur le pWR100 de *S. flexneri* 2a et 5a (**Fig. 6**). Son précurseur fait 146 kDa (1364 aa), son domaine *passenger* 109,1 kDa et c'est le seul *passenger* des SPATEs de *Shigella* dont la structure a été cristallisée (PDB ID: 5J44) (44) (**Fig. 13**). Elle appartient à la classe II car elle ne présente pas d'effet cytotoxique sur les cellules épithéliales en culture ; ses substrats spécifiques ne sont pas aussi bien caractérisés que ceux de Pic. Il a premièrement été décrit que SepA n'est pas indispensable pour l'invasion des cellules épithéliales (65) et ce n'est pas une hémagglutinine. Cependant, dans un modèle d'iléon de lapin, il a été montré qu'un mutant $\Delta sepA$ présente une virulence atténuée comparée à la souche WT de *S. flexneri* 5a (65). Des observations similaires ont été faites dans un modèle d'explant humain ; la virulence d'un mutant $\Delta sepA$ est atténuée du fait de la diminution des dommages causés à la muqueuse intestinale et de la réduction significative de la desquamation des cellules intestinales (66). Par la suite, A. Maldonado-Contreras *et al.* ont montré que SepA est responsable de la destruction de la barrière épithéliale de l'intestin en favorisant l'activation la cofiline, une protéine responsable de la déstabilisation de l'actine, via LIMK1 et LIMK2 (2 régulateurs de la famille des kinases LIM), déstabilisant fortement les jonctions serrées entre les cellules (44). Plus récemment, il a été montré que SepA clive l' α 1-antitrypsine (ou AAT), un inhibiteur de protéases à sérine présent dans le plasma. C'est la première réelle cible de SepA identifiée à ce jour. Le clivage de l'AAT par SepA induit la production d'une molécule chémoattractante (cAAT = AAT C-terminal peptide) pour les neutrophiles, qui sont recrutés en masse (1,6 fois plus que dans la condition sans la production de cAAT) au niveau de la barrière épithéliale et induisent son altération par leur transmigration qui facilite le passage des *Shigella* (67). Actuellement nous menons des travaux dans le laboratoire, afin de caractériser les fonctions de SepA. Nous avons déjà mis en évidence le clivage par SepA d'une protéine prenant part à la formation d'un complexe intracellulaire de signalisation de l'immunité innée (données non publiées). À l'heure actuelle, la capacité ou non de SepA à pénétrer dans les cellules hôtes n'est pas connue.

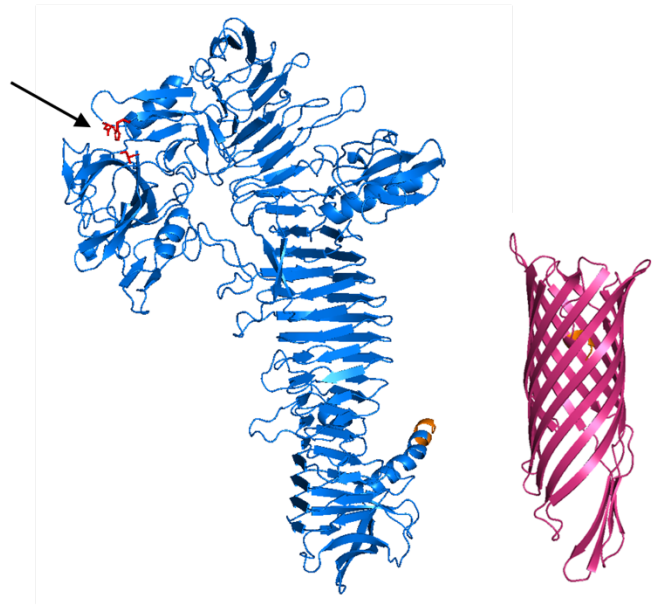


Figure 13 : Structure tridimensionnelle du domaine *passenger* et du domaine β de translocation de SepA. Les différents domaines (*passenger* en bleu, *linker* en orange et β -*barrel* en rose foncé) sont représentés en « *cartoon* » à l'aide du logiciel PyMol. La triade catalytique (H134, D162 et S267) est représentée en « *sticks* » en rouge au niveau de la flèche. *Passenger* PDB ID: 5J44 ; domaine β : prediction Alphafold basée sur ID Uniprot Q8VSL2.

iii. SigA

Le gène *sigA* (pour « *Shigella IgA-like homolog* ») code pour une protéine précurseur de 139,6 kDa et le domaine *passenger* de SigA fait 103 kDa. La sérine catalytique de SigA se situe en position 258. Le gène *sigA* est présent dans le génome de *S. sonnei* et *S. flexneri* 2a. SigA est la seule SPATE de *Shigella* appartenant à la classe I des protéines cytotoxiques. En effet, cette entérotoxine clive l' α -fodrine, composant du cytosquelette d'actine, induisant un changement drastique de morphologie chez les cellules HEp-2 infectées avec *S. flexneri* 2a (68) exactement comme ce qui a été observé pour Pet chez EAEC (69). Par ailleurs, K. Al-Hasani *et al.* ont également montré que SigA est responsable d'une accumulation de fluide dans un modèle d'iléon de lapin (51) expliquant les diarrhées liquides, symptôme typique de la shigellose. Le facteur V de coagulation est aussi une cible de SigA. Comme pour SepA, les mécanismes d'entrée et de transport de SigA dans les cellules cibles n'ont pas encore été déterminés. Cependant une étude suggère que la partie N-term de son domaine *passenger* (aa 54 à aa 397 - portant la triade catalytique) est nécessaire à son activité protéolytique sur de la caséine (substrat validé de SigA) et que la partie C-term (de l'aa 398 à l'aa 1008) est

nécessaire à la liaison de la protéase sur les cellules Hep-2 en culture (70). En revanche, le mécanisme de liaison de SigA sur les cellules cibles reste toujours à élucider.

Tous ces résultats suggèrent que SigA joue un rôle essentiel dans la pathogenèse de *Shigella*, bien que des travaux soient encore nécessaires pour en comprendre les mécanismes moléculaires.

SPATE Classe	Localisation gène	Taille précurseur	Taille protéine mature	Triade catalytique	Cristallisation ou model 3D prédictif	Fonctions
SigA Classe I	Chromosome <i>S. sonnei</i> et <i>S. flexneri</i> 2a	139,6 kDa (1285 aa)	103 kDa	H126/D154 /S258	Aucun	Clive l'α-fodrine, accumulation de fluide dans l'intestin, dégrade caséine et facteur V
SepA Classe II	Plasmide de virulence <i>S. flexneri</i> 2a et 5a	146 kDa (1364 aa)	109,1 kDa	H134/D162 /S267	Cristallisation (Fig. 13) PDB : 5J44 AlphaFold : Q8VSL2	Requise pour l'invasion des cellules épithéliales par activation de la cofiline, clive α1-antitrypsine
Pic Classe II	Chromosome <i>S. flexneri</i> 2a	146,4 kDa (1372 aa)	109,8 kDa	H127/D155 /S258	AlphaFold : Q54151	Mucinase, hypersécrétion de mucus, modulation immunitaire, cible les protéines O-glycosylées à la surface des leucocytes, dégradation protéines du complément (C2, C3, C3b, C4, C4b, C5), hémagglutinine, clive facteur V

Figure 14 : Tableau récapitulatif des fonctions et de l'organisation structurale des SPATEs de *S. sonnei*, *S. flexneri* 2a et 5a.

Les fonctions des SPATEs et notamment celles de SepA et SigA restent toujours très peu connues (**Fig. 14**). Cependant, les études qui ont déjà été menées laissent à penser que ces protéases jouent un rôle essentiel dans la subversion de l'immunité de l'hôte permettant à *Shigella* de survivre et de se disséminer dans la muqueuse colique.

4. La pathogenèse

La pathogenèse de *Shigella* repose sur sa capacité à envahir, coloniser et détruire spécifiquement la muqueuse colique. *Shigella* doit traverser 5 grandes barrières protectrices : le microbiote intestinal, la couche de mucus colique, la barrière intestinale, le système immunitaire et la barrière endothéliale des vaisseaux sanguins. Mais avant de rencontrer ces

différents « obstacles », la bactérie doit survivre aux fortes variations des conditions environnementales rencontrées lors de son passage dans le tractus gastro-intestinal (TGI), notamment des variations de pH.

a. Résistance dans le tractus digestif

Lorsque la bactérie est ingérée par l'hôte, elle migre vers l'estomac où le pH est compris entre 1.0 et 2.0 (Fig. 15). Ce pH acide est dû aux acides gastriques qui ont une fonction bactéricide. *Shigella* est capable de survivre plus de 2 h dans un environnement acide (pH 2.0) tout en conservant sa capacité à envahir les cellules épithéliales (71). Ensuite *Shigella* atteint le duodénum, le jéjunum et l'iléum (composant le petit intestin) et enfin le côlon, qui est le site préférentiel d'invasion. Tout au long de ces étapes à 37°C, le pH change. Le pH de l'intestin grêle varie de 6.0 à 7.5 et le pH du côlon est d'environ 7.0 (72). Il a été démontré que le gène *rpoS* codant pour le facteur sigma 38 est responsable de cette résistance aux acides chez *Shigella*, *E. coli* K12 mais aussi *Salmonella typhimurium* (73).

Après avoir atteint le côlon, *Shigella* doit faire face aux bactéries du microbiote intestinal.

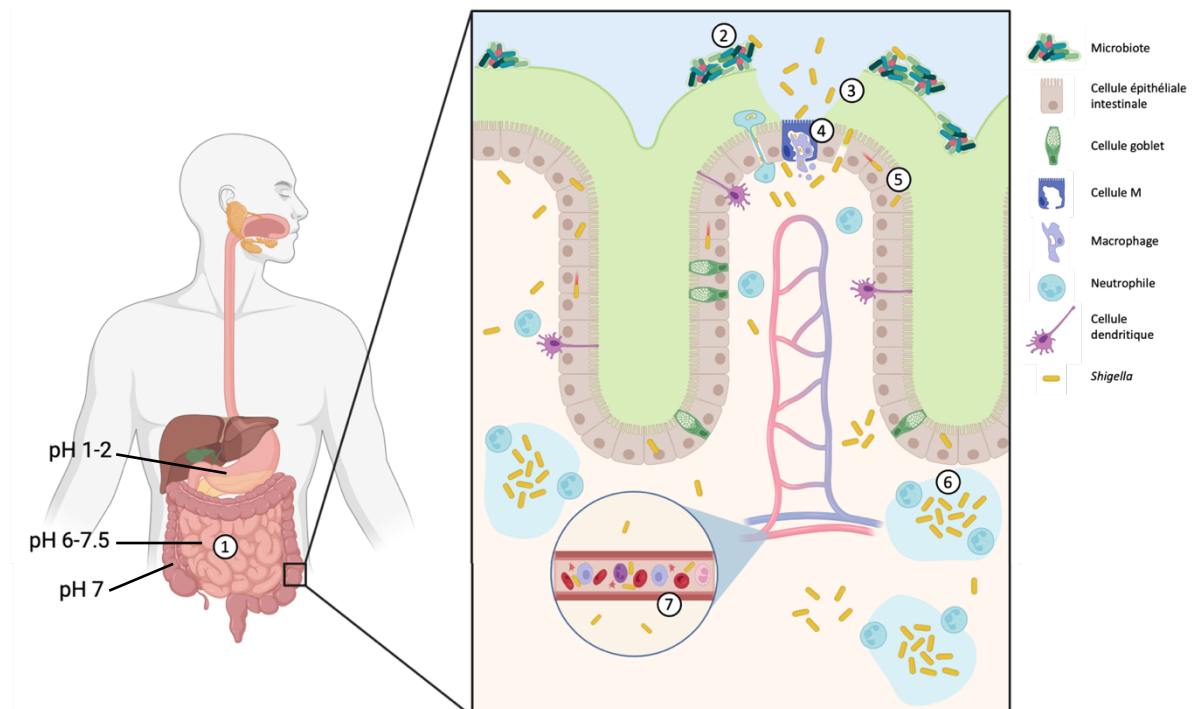


Figure 15 : Les grandes étapes de la colonisation du tractus gastro-intestinal par *Shigella*. *Shigella* s'adapte aux différents pH rencontrés tout au long du TGI (1) puis entre en contact avec les micro-organismes du microbiote intestinal (2). La couche de mucus est la seconde

barrière que *Shigella* traverse grâce à ses facteurs de virulence comme Pic (3). L'invasion de la barrière épithéliale intestinale se fait via les cellules M et les macrophages résidents (4). Une fois passée du côté basal de l'épithélium, *Shigella* entre du côté basolatéral des cellules, s'y réplique et s'y dissémine grâce à la manipulation du cytosquelette d'actine via IcsA (5). Dans la muqueuse colique, *Shigella* forme des foyers hypoxiques d'infection auprès desquels les neutrophiles sont retrouvés en grande quantité (6). Si l'immunité n'arrive pas à maîtriser l'infection, *Shigella* va passer la barrière endothéliale des vaisseaux sanguins et se disséminer dans le sang (7).

b. Compétition avec le microbiote intestinal

Avant d'envahir l'épithélium colique, *Shigella* doit établir une niche dans la lumière intestinale, colonisée à l'état basal par le microbiote intestinal, qui représente une barrière complexe composée de plus de 1000 espèces bactériennes. Il a été montré en 2019 que des souches commensales d'*E. coli* peuvent sécréter une microcine (MccPDI) inhibant deux souches d'EHEC ainsi que des souches de *Shigella* (74). Du fait de la faible dose de *Shigella* nécessaire à l'infection, ce pathogène a dû développer des mécanismes de « contre-attaque » pour entrer en compétition avec ces bactéries du microbiote intestinal. *S. sonnei* est capable de sécréter des colicines qui vont cibler des commensaux (75). C'est ce que nous avons également démontré dans notre article présenté en Annexe page 132 (25). Cependant, *S. flexneri* (qui ne sécrète pas de colicine) parvient également à traverser la barrière du microbiote en modulant la taille de l'OAg de son LPS et une étude a suggéré que cela permettrait une meilleure résistance aux colicines sécrétées par les commensaux, comme la colicine E2 (76, 77). De plus, l'importance de l'alimentation sur la richesse du microbiote en lien avec la résistance aux infections par *Shigella* est actuellement un domaine de recherche en pleine expansion.

La première barrière étant franchie, *Shigella* rencontre ensuite une seconde barrière physique correspondant à la couche de mucus présente à la surface des cellules épithéliales du côlon (Fig. 15).

c. Passage du mucus

Le mucus du côlon humain est une épaisse couche de polymère composée en grande partie de mucines glycosylées sécrétées par les cellules caliciformes et de peptides antimicrobiens. Cette barrière protège les cellules épithéliales intestinales des stimulus inflammatoires comme les pathogènes ou les molécules toxiques provenant de la nourriture ingérée.

L'épaisseur de la couche de mucus augmente au sein du TGI et sa composition peut varier selon la position dans le TGI. On retrouve une couche de mucus unique dans l'intestin grêle et deux épaisses couches de mucus superposées (la couche extérieure « lâche » et la couche inférieure « resserrée ») dans le côlon (78). Pic est la seule SPATE qui possède une activité de dégradation des mucines (37, 60) et n'est pas sécrétée par toutes les souches de *Shigella*. Des recherches sont encore nécessaires pour comprendre l'ensemble des mécanismes de virulence de *Shigella* impliqués dans ce franchissement.

La couche de mucus étant détruite, le pathogène atteint la barrière épithéliale intestinale au niveau de laquelle le processus d'invasion va se poursuivre.

d. Invasion de la barrière épithéliale et dissémination

Afin d'établir une infection productive, *Shigella* a développé différentes stratégies pour envahir la barrière épithéliale du côlon. Le premier contact se fait via IcsA, OspE1 et OspE2 qui favorisent l'adhésion au niveau du pôle apical des cellules M (*microfold cells*) (79, 80). De manière T3SS-dépendante, via la sécrétion d'effecteurs, la bactérie va provoquer son internalisation dans une vacuole de transcytose de la cellule M et sera ensuite transportée dans un compartiment intra-épithélial afin d'être endocytée par les macrophages résidents (**Fig. 16**). *Shigella* s'échappe rapidement du phagosome du macrophage en provoquant sa pyroptose du côté basal de l'épithélium. C'est par le pôle basolatéral des cellules que *Shigella* va envahir de nouveau la barrière épithéliale, quitter le phagosome, se répliquer et se disséminer, via IcsA, dans les cellules avoisinantes en utilisant leur cytosquelette d'actine (*actin comet tail*) (**Fig. 16**). Ces différents mécanismes vont induire chez l'hôte une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-1 β (IL-1 β) et l'interleukine-18 (IL-18). Ces cytokines médient l'inflammation, qui sera également exacerbée par l'activation via l'IL-18 des cellules *Natural Killer* (cellules NK), promouvant la production d'interféron gamma (IFN- γ), et la destruction des entérocytes. Cette ouverture de la barrière épithéliale facilitera le passage des *Shigella* du pôle apical au pôle basal. De plus, le récepteur intracellulaire Nod-1 va détecter le peptidoglycane (PGN) de la bactérie et médier la sécrétion d'interleukine-8 (IL-8) via l'activation du facteur nucléaire (NF- κ B), induisant un recrutement massif de neutrophiles sur le site de l'infection (81). Ces neutrophiles vont transmigrer au travers les cellules épithéliales et ouvrir un passage facilité pour les *Shigella* (**Fig. 16**) (82).

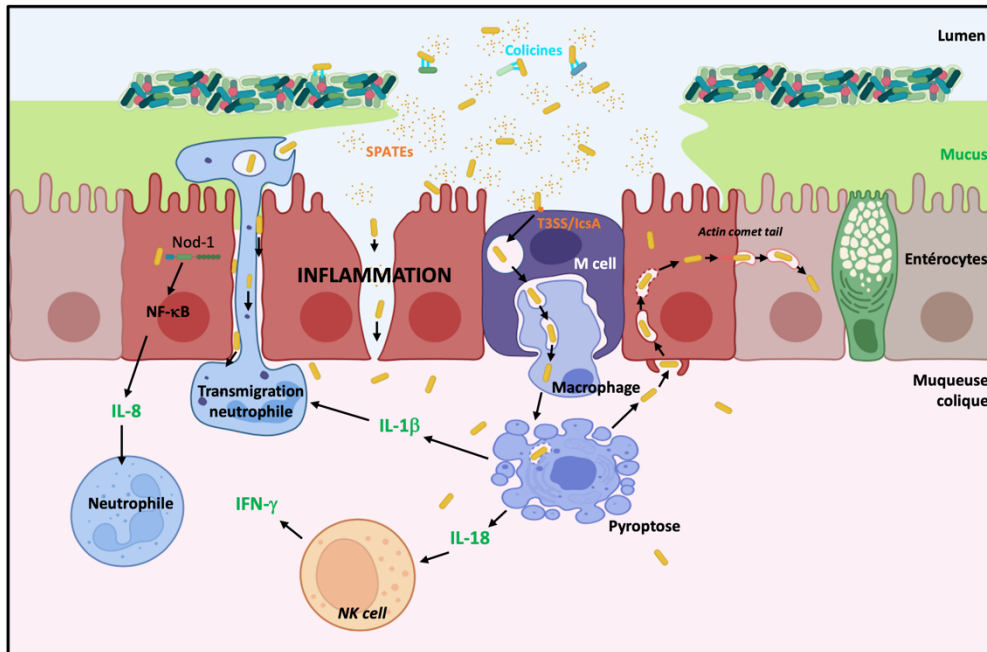


Figure 16 : Représentation schématique des différents mécanismes développés par *Shigella* permettant l'invasion de la barrière épithéliale et la dissémination. (Adaptée de (15, 83))

e. Formation de foyers hypoxiques d'infection et oxygénation

Les niveaux d'oxygène varient tout au long du cycle infectieux, c'est pourquoi, *Shigella* a su s'adapter à ses différentes niches lui conférant un avantage sélectif important. C'est une bactérie anaérobie facultative possédant à la fois une chaîne respiratoire aérobie et une chaîne anaérobie, ce qui lui permet de s'adapter aux différentes concentrations d'O₂ rencontrées au cours de l'infection, et donc optimiser sa survie, sa réplication et sa dissémination dans les sites infectieux. *Shigella* est notamment capable d'utiliser le nitrate comme accepteur d'électrons pour produire de l'énergie dans des environnements anoxiques ou hypoxiques. C'est d'ailleurs pourquoi on retrouve majoritairement des bactéries anaérobies facultatives dans la liste des pathogènes prioritaires de l'OMS (**Fig. 24**) (Voir revue 1 en Annexe p.122) (84).

Dans le lumen la pression partielle en O₂ (pO₂) est comprise entre 0 et 2 mmHg (millimètre de mercure) (**Fig. 17**). Au niveau de la surface des entérocytes, la pO₂ augmente (40 mmHg) du fait de la diffusion d'O₂ provenant des capillaires sanguins sous-épithéliaux. Au niveau de la muqueuse, la pO₂ chute à 24 mmHg et notre équipe a démontré, grâce à un marqueur de l'hypoxie (EF5), que la respiration active des *Shigella* provoque la formation de foyers

hypoxiques d'infections (**Fig. 15 et 17**) (85). On y retrouve des bactéries en « *cluster* », la migration de neutrophiles et une pO_2 inférieure à 8 mmHg (32).

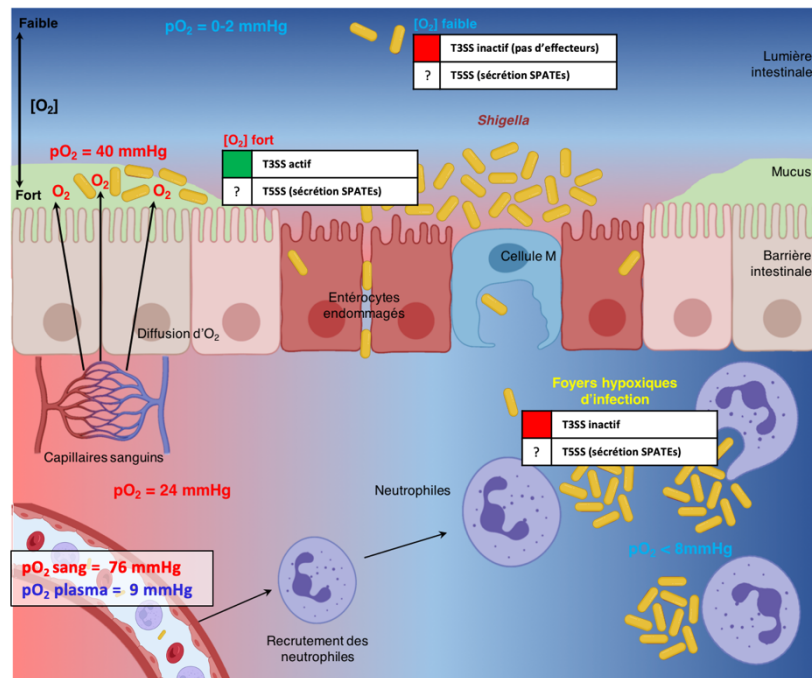


Figure 17 : Induction d'une hypoxie infectieuse lors de l'infection par *Shigella*. Au niveau de la lumière intestinale, l'environnement est quasi anoxique ($pO_2 = 0-2$ mmHg) induisant une inactivation du T3SS. Grâce à la diffusion d' O_2 à travers la barrière intestinale par les capillaires sanguins sous-épithéliaux, la concentration d' O_2 augmente à la surface des tissus non endommagés ($pO_2 = 40$ mmHg) et permet une activation du T3SS impliqué dans l'invasion des entérocytes. Lors de l'invasion et de la répllication de *Shigella*, des foyers d'infection se forment. Les neutrophiles migrent en quittant la circulation sanguine et sont recrutés (IL-8, IL-1 β) sur le site infectieux. Dans les foyers d'infection, l'hypoxie est induite grâce à la respiration aérobie de *Shigella*. Dans cet environnement où la concentration d' O_2 est inférieure à 8 mmHg, le T3SS est inactif.

Afin de détecter la disponibilité de l'oxygène dans le microenvironnement, *Shigella* possède plusieurs voies de régulation et notamment la voie FNR (*Fumarate Nitrate reductase Regulator*) qui est connue pour être un régulateur du métabolisme anaérobie. Chez *Shigella*, en anaérobie, FNR va réprimer la transcription des gènes de virulence *spa32* et *spa33* impliqués dans la formation de la seringue du T3SS et l'injection d'effecteurs. En conséquence, en absence d'oxygène le T3SS est inactif et en présence d'oxygène, la répression de FNR est levée et le T3SS activé (29). Pour le moment, aucune recherche n'a été faite sur la régulation par l'oxygène de la sécrétion des SPATEs. Récemment notre équipe a également développé des méthodes précises de quantification de l'ascorbate et de la pO_2

dans les fluides corporels comme le sang et le plasma (86). Le sang est très oxygéné, puisque que les hématies transportent l'O₂ via l'hémoglobine. La pO₂ dans le sang est d'environ 76 mmHg et la pO₂ du plasma est de 9 mmHg (**Fig. 17**). La fraction plasmatique du sang est peu oxygénée car la solubilité de l'O₂ dans le plasma est limitée (~0,3 ml d'O₂/100 ml de sang) et l'O₂ est principalement associé aux hématies (>98% d'O₂ transporté). Par ailleurs, notre équipe a également montré que l'ascorbate plasmatique contribue à la réduction de l'O₂ dans le plasma (86).

Ce sont dans les vaisseaux sanguins que se déroule l'étape tardive du cycle infectieux de *Shigella* qui correspond à la bactériémie.

f. Passage de la barrière endothéliale des vaisseaux sanguins

Cette étape clé du cycle de virulence de *Shigella* est probablement la moins étudiée du fait de l'absence, jusqu'à récemment, d'un modèle animal de shigellose permettant de la reproduire.

Dans un modèle de cobayes carencés en ascorbate que notre laboratoire a développé, nous avons initialement rapporté qu'une bactériémie était induite 48 h après l'infection par *S. flexneri* 5a (87) (**Fig. 18**), confirmant que *Shigella* peut atteindre et coloniser les vaisseaux sanguins, mais également potentiellement y survivre en échappant au système immunitaire de l'hôte. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués restent inconnus.

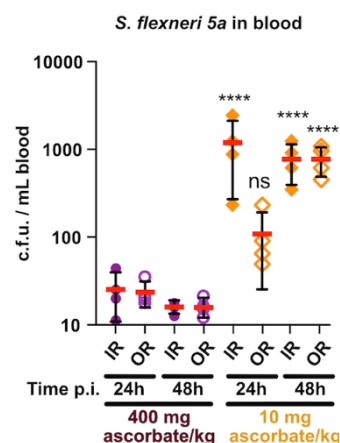


Figure 18 : Les cobayes déficients en ascorbate sont sensibles à l'infection par *S. flexneri* 5a, lors d'une infection intra-rectale (IR) ou orale (OR), sur des périodes prolongées. La translocation potentielle de *S. flexneri* 5a dans la circulation sanguine a été évaluée en plaçant des échantillons de sang sur des boîtes de pétri TSB. Les résultats sont exprimés en moyenne

± écart-type, 'ns' indique un test-t $p > 0.05$, **** indique $p < 0.0001$ (4 animaux par groupe). (Figure tirée de Skerniskyte *et al.* 2023 (87)).

Il a été initialement rapporté que les shiga-toxines de *S. dysenteriae* ciblent les cellules endothéliales, favorisant la bactériémie et le syndrome hémolytique et urémique (HUS) qui s'ensuit (88) bien qu'il ait été démontré que toutes les espèces de *Shigella* peuvent provoquer une bactériémie (*S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. boydii* et *S. dysenteriae*) (**Fig. 28**) (89). Par ailleurs, une souche de *Stx-producing E. coli* (STEC) produit une Stx similaire à celle de *Shigella* qui peut bloquer la traduction en clivant l'ARN ribosomal 28S dans les cellules endothéliales, menant à leur mort. Des lésions endothéliales ont été rapportées chez des patients souffrant de shigellose, associées à des hémorragies, une congestion et une dilatation des capillaires situés dans la muqueuse intestinale (90). L'ensemble de ces caractéristiques physiopathologiques associées à la shigellose suggère fortement qu'au cours du processus infectieux, les souches de *Shigella* sont exposées à des composants plasmatiques, que ce soit au niveau des sites infectieux ou dans la circulation sanguine au cours de la bactériémie.

Il existe de nombreux mécanismes décrits chez les bactéries leur permettant de traverser la barrière endothéliale et de persister dans les cellules endothéliales et dans le sang. UPEC et *Bacillus anthracis* médient l'inflammation grâce à leurs toxines (CNF-1 chez UPEC et *Letal Factor* chez *Bacillus*). *S. aureus* peut détruire le cytosquelette d'actine pour former un tunnel de passage et moduler les jonctions cellulaires pour mener à son internalisation dans les cellules endothéliales tout comme *Neisseria meningitidis*, *Rickettsia spp.* et *Coxiella spp.* s'échappent des phagosomes et persistent dans la barrière endothéliale. Quant à *Clostridium sordellii* et STEC, ils induisent la mort de la cellule (91).

Si les mécanismes sont peu connus chez *Shigella*, il a été démontré que Sat, TagB, TagC et Sha, des SPATeS d'*Extraintestinal Pathogenic E.coli* (ExPEC) et d'UPEC, permettent l'internalisation des bactéries dans les cellules de reins, de vessie ou de côlon et/ou une destruction du cytosquelette d'actine (92–94) et pourraient être nécessaires à la septicémie. Il est donc naturel de se questionner sur le rôle des SPATeS de *Shigella* dans le processus de bactériémie.

II. Subversion de la réponse immunitaire par *Shigella* et passage dans le sang

Brièvement, le système immunitaire contre les pathogènes produit une réponse rapide afin de reconnaître un antigène (Ag) étranger, d'activer et de mobiliser des forces pour se défendre et contrôler l'infection. Les premières barrières de défense sont les barrières physiques et chimiques comme décrit ci-dessus. Si le pathogène arrive à traverser ces différentes barrières de protection, ce qui est le cas de *Shigella*, alors le risque d'infection augmente fortement. Les réponses immunitaires humorale et cellulaire sont alors induites. Les leucocytes (ou globules blancs) sont notamment recrutés au site de l'infection afin de contenir la dissémination du pathogène. Il y a donc d'abord une réponse de l'immunité innée qui agit efficacement dès la première rencontre avec le pathogène mais qui n'est pas spécifique. En parallèle se met en place l'immunité acquise (adaptative ou spécifique) permettant de mémoriser l'Ag spécifique au pathogène afin de pouvoir l'attaquer beaucoup plus rapidement et efficacement si une deuxième rencontre devait se produire.

La plupart des pathogènes, dont *Shigella*, ont développé un panel de stratégies leur permettant de contourner l'immunité et de favoriser leur survie et leur dissémination au sein de l'hôte.

1. La détection de *Shigella* par le système immunitaire et l'activation de la réponse immunitaire lors de l'infection

La reconnaissance de *Shigella* par le système immunitaire se fait via ses PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), le lipide A du LPS et le PGN, qui sont reconnus par les PRRs (*pattern recognition receptors*) de la cellule. Les PRRs correspondent au TLR4 présent à la surface des cellules ou aux récepteurs intracellulaires Nod. Le TLR4, associé avec le facteur de différenciation MD2 (*myeloid differentiation factor 2*) reconnaissent le LPS et induisent majoritairement les voies de signalisation dépendantes de MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) ou TRIF (*TIR domain-containing adaptator-inducing IFN- β*). Ces voies de

signalisation convergent vers l'activation de NF- κ B et MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) permettant la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 et TNF- α et β) et vers la voie induisant l'IFN de type I (95, 96). Des fragments de PGN relargués par *Shigella* sont quant à eux reconnus par les récepteurs Nod1 (exprimé par toutes les cellules) et Nod2 (exprimé par les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques) quand la bactérie est internalisée dans les cellules. Cette reconnaissance va permettre l'activation de la voie NF- κ B et donc la production de cytokines pro-inflammatoires essentielles à l'élimination de la bactérie.

Shigella est déjà capable, dès sa reconnaissance par le système immunitaire, de contourner ces mécanismes en modifiant la composition de son LPS et probablement aussi de son PGN (9, 10). Le T3SS de *Shigella* reste pour le moment l'élément essentiel le mieux décrit pour sa survie dans la muqueuse colique.

2. La capacité de *Shigella* à contrecarrer le système immunitaire de l'hôte

Comme la plupart des pathogènes humains, *Shigella* possède des mécanismes de contournement de l'immunité de l'hôte lui permettant de favoriser sa survie et sa dissémination ; ces stratégies peuvent être dépendantes ou indépendantes du T3SS.

a. La balance de l'inflammation via le T3SS

De nombreux mécanismes permettant à *Shigella* de contrecarrer le système immunitaire de l'hôte sont dépendants du T3SS. Lors de sa vie intracellulaire (cellules M, cellules épithéliales et macrophages), *Shigella* provoque rapidement la rupture du compartiment vacuolaire/phagocytaire grâce à son T3SS via les effecteurs Ipa (IpaB, C, IpaH7.8) et se réplique dans le cytosol. Chez les macrophages, ceci s'accompagne de la formation de l'inflammasome (via MxiH et MxiI) (97) et de l'activation de la caspase-1 qui clive et active les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et l'IL-18) et induit par la suite la mort cellulaire lytique, aussi appelée pyroptose. Ces cytokines provoquent le recrutement massif des neutrophiles et l'activation des cellules NKs et des lymphocytes T (LTs) qui produisent l'IFN- γ (**Fig. 16**) (98). Un défaut de production d'IL-1 β (démonstré chez des souris infectées avec un mutant IpaH7.8) produit une colonisation atténuée, puisque le recrutement des neutrophiles et leur

transmigration au niveau de la barrière épithéliale favorisent le passage de *Shigella* de manière indépendante des cellules M. De manière très intéressante, *Shigella* est capable de réguler très finement ses stratégies de modulation de l'immunité en fonction de son cycle infectieux. En effet, la bactérie est capable également d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires en altérant la transduction du signal permettant l'activation de la voie NF- κ B et ainsi promouvoir l'infection et la dissémination au profit de l'inflammation. Ceci est possible grâce à différents effecteurs du T3SS comme OspG (99) ou OspI (100).

Toujours de manière dépendante du T3SS, *Shigella* perturbe le recrutement des cellules dendritiques en réprimant la transcription de la CCL20 (*receptor for the chemokine ligand 20*) et bloque la transcription de molécules antimicrobiennes comme la β -défensine impliquée dans le chimiotactisme des monocytes, des lymphocytes T (LTs) et des cellules dendritiques (DCs) immatures et la production de cytokines (101). Il a aussi été montré que IpaD permet l'induction de l'apoptose des lymphocytes B (LBs) qui ne peuvent plus se différencier en plasmocytes et produire des IgA sécrétoires (102, 103). Ces mécanismes perturbent la réponse immunitaire adaptative et la réponse adaptative à médiation humorale. L'absence des DCs sur le site d'infection perturbe l'activation des LTs naïfs dans les ganglions lymphatiques mésentériques qui ne peuvent donc pas cibler les bactéries présentes dans muqueuse colique. De plus, la migration des LTs est bloquée par l'effecteur IpgD du T3SS de *Shigella* (104).

Ainsi, *Shigella* est capable de contourner le système immunitaire, majoritairement via son T3SS. Or, le T3SS est inactif en absence d'O₂ suggérant qu'en plus des mécanismes décrits précédemment, *Shigella* possède également des stratégies de subversion de l'immunité de l'hôte indépendantes du T3SS, faisant intervenir d'autres facteurs de virulence comme IcsP ou encore les SPATEs.

b. La subversion de l'immunité indépendante du T3SS

Il a été démontré qu'IcsP, une aspartyl-protéase de *Shigella* de la famille des omptines, peut contrecarrer l'autophagie en ciblant la protéine C3 du complément déposé à la surface des *Shigella*. À la surface des pathogènes intracellulaires, C3 interagit avec l'ATG16L1 (*autophagy related 16 like 1*) activant l'autophagie des cellules épithéliales limitant la propagation du

micro-organisme. IcsP va, en partie, à l'aide d'autres mécanismes inconnus, dégrader les molécules de C3 à la surface de la bactérie conduisant à l'inhibition de l'autophagie des cellules épithéliales et favoriser la dissémination (105). Toutefois dans cette étude, les auteurs n'ont pas analysé le rôle d'IcsP dans l'inactivation de la cascade du complément médiée par la protéine C3. Cet aspect a été précédemment étudié, notamment via l'activité protéolytique des SPATEs sécrétées par diverses bactéries entéropathogènes.

3. L'inactivation du système du complément par les SPATEs

a. Le système du complément

Le système du complément est un élément essentiel de l'immunité permettant le ciblage et la destruction des pathogènes mais encore l'induction de l'inflammation, la modulation de l'activité des LBs et LTs lors d'une infection ou le maintien de l'homéostasie de la cellule. Lors de la reconnaissance d'un pathogène par le système immunitaire, rapidement, le système du complément est activé par une cascade de protéines plasmatiques (plus de 40) interagissant à travers trois voies distinctes : la voie classique (CP), la voie des lectines (LP) et la voie alternative (AP) (**Fig. 19**).

La première voie (CP) repose sur la liaison du composant C1q du complément à des antigènes (notamment les LPS et les porines) ou à des anticorps à la surface des agents pathogènes. De même, la seconde voie (LP) est activée lorsque le MBL (*Mannose-Binding Lectin*) se lie au mannose ou à d'autres sucres (glucose ou N-acetyl-glucosamine) à la surface des agents pathogènes. Les deux premières voies conduisent au clivage de C2 et C4 en leur forme active C2b et C4b, qui forment une C3-convertase. La troisième voie (AP) est activée lorsque le composant C3 du complément est spontanément hydrolysé dans le plasma. La forme hydrolysée C3(H₂O) lie le facteur B, et est ensuite clivée par le facteur D. Le complexe résultant, C3(H₂O)Bb, est une C3-convertase active.

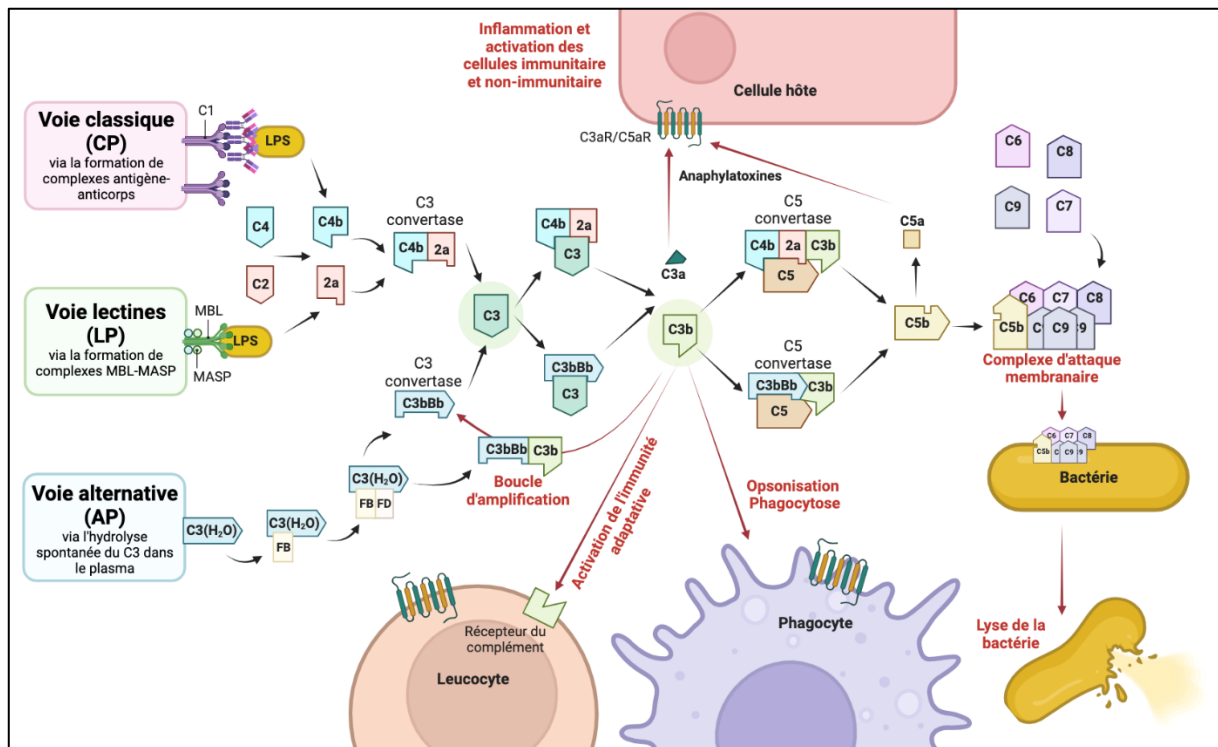


Figure 19 : Les trois voies du système du complément chez l'humain. La voie classique (CP), la voie des lectines (LP) et la voie alternative (AP) convergent toutes vers le clivage de C3 en C3a et C3b par la C3 convertase. La protéine C3b joue un rôle majeur, puisqu'elle est impliquée directement ou indirectement dans de nombreux processus indispensables à l'hôte pour se défendre contre le pathogène : activation de l'inflammation, opsonisation et phagocytose, formation du complexe d'attaque membranaire et lyse du pathogène, activation de l'immunité adaptative et activation de la boucle d'amplification du système du complément qui active l'AP. (Figure inspirée de (106)).

Ainsi, les trois voies convergent vers la formation d'une C3-convertase qui clive la protéine centrale du système du complément, C3, en sa forme active C3b et l'anaphylatoxine C3a (**Fig. 20**). Le C3b, se lie directement à la surface des agents pathogènes, selon un mécanisme appelé opsonisation. Les opsonines sont reconnues par les phagocytes, ce qui favorise la phagocytose des agents pathogènes envahissants. D'autre part, C3b se liera à la C3 convertase déjà existante (C4b2a pour CP/LP ou C3bBb pour AP) et formera la C5-convertase ((C4b2a)C3b pour CP/LP ou (C3bBb)C3b pour AP) qui clivera le C5 en C5b et l'anaphylatoxine C5a. Le plus grand produit de C5, C5b, se lie à C6, C7, C8 et plusieurs copies de C9 pour former un complexe d'attaque membranaire (MAC) qui crée des pores à la surface des agents pathogènes, entraînant la mort bactérienne médiée par le complément. D'autre part, C3a et C5a activent des protéines G à la surface des leucocytes (C3aR, C5aR), ce qui entraîne une réponse inflammatoire (**Fig. 19**). Le système du complément est à l'interface de la réponse

immunitaire dans le plasma et dans le tissu infecté. La forme active, C3b, perméabilise l'endothélium, ce qui facilite la transmigration des leucocytes, et la diffusion locale de protéines plasmatiques comme des immunoglobulines et des composants du complément des vaisseaux sanguins vers le tissu infecté (106, 107).

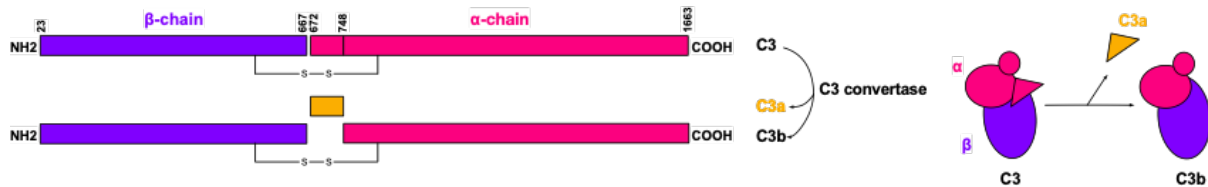


Figure 20 : Représentation schématique du clivage de C3 en C3a et C3b par la C3-convertase. La chaîne α est représentée en rose, la chaîne β en violet et l'anaphylatoxine C3a en orange.

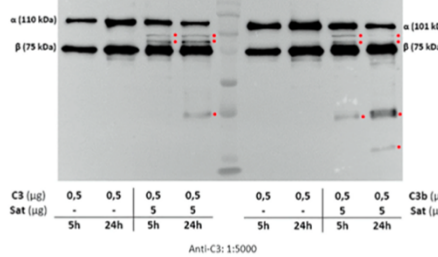
b. Inactivation du système du complément par les SPATEs

Les pathogènes ont développé au cours de l'évolution un panel de stratégies leur permettant d'inactiver le système du complément. Certains sont notamment capables de produire une capsule qui leur permet d'éviter leur reconnaissance par le système du complément, d'autres sont capables de sécréter des facteurs de régulation du complément ou des protéines inactivant directement des composants du système du complément. C'est le cas de *S. aureus* qui possède de nombreux mécanismes d'inactivation du complément et qui sécrète une métalloprotéase : l'auréolysine. Celle-ci dégrade la protéine C3 en l'inactivant et en conduisant à la destruction des produits formés par cette protéolyse (108). Chez les entérobactéries, il a été montré qu'EspP, Sat et Pic, des SPATEs sécrétées par EHEC, UPEC et *S. flexneri* 2a sont aussi capables de cliver les protéines du complément (**Fig. 21**), que ce soit des SPATEs de classe I ou de classe II.

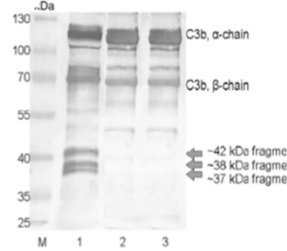
A

	SPATEs (espèces)	Cibles du complément	Références
SPATEs de classe I	EspP (EHEC)	C3, C3b, C5	Orth <i>et al.</i> 2010. <i>Infect. Immun.</i>
	Sat (UPEC)	C2, C3, C3b, C4, C4b, C5, C6, C7, C8, C9	Freire <i>et al.</i> 2022. <i>Front. Immunol.</i>
	SigA (<i>Shigella</i>)		?
SPATEs de classe II	Pic (<i>Shigella</i> /EHEC/ExPEC)	C2, C3, C3b, C4, C4b, C5	Abreu <i>et al.</i> 2015. <i>J. Infect. Dis.</i>
	SepA (<i>Shigella</i>)		?

B



C



D

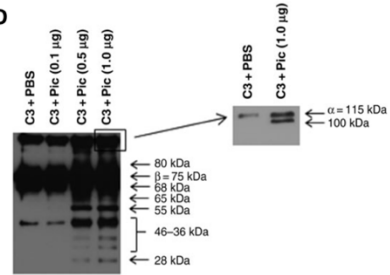


Figure 21 : Récapitulatif des cibles des SPATEs d'EHEC, UPEC et *Shigella* parmi les protéines du complément. (A) Tableau récapitulatif des protéines du complément ciblées par les SPATEs EspP, Sat et Pic. Aucune étude n'a montré un clivage des protéines du complément par SigA et SepA chez *Shigella*. **(B)** Western blot de l'incubation de Sat avec C3. Les étoiles rouges indiquent les bandes de clivage qui apparaissent après 5 ou 24h d'incubation de 0,5 µg de C3 avec 5 µg de Sat. **(C)** Western blot de l'incubation de 1 µg d'EspP avec 2 µg de C3b pendant 12h. Ligne M : marqueur moléculaire, ligne 1 : C3b + EspP, ligne 2 : C3b + EspP_{S263A} (EspP muté sur sa sérine catalytique donc inactif), ligne 3 : C3b + tampon. **(D)** Western blot de l'incubation de 0,5 µg de C3 avec Pic (0.1, 0.5 et 1 µg). La flèche sur le côté droit indique un panel pour lequel la membrane a été moins exposée. Panels B, C et D tirés des articles Freire *et al.* 2022 (64), Orth *et al.* 2010 (39) et Abreu *et al.* 2015 (63) respectivement.

EspP cible 3 protéines du complément, Sat en cible 10 et Pic en cible 6. Dans la **figure 21** ci-dessus, nous remarquons que les protéines du complément C3, C3b et C5 sont des cibles préférentielles pour les SPATEs. Le clivage de C3, la protéine centrale du système, entraîne une inhibition partielle des 3 voies du complément par la formation de fragments inactifs C3a-like, C3b-like. L'opsonisation et la phagocytose du pathogène sont ralenties, ainsi que la formation du MAC et l'activation des signaux d'inflammation via les récepteurs des anaphylotoxines C3a et C5a présents à la membrane des cellules immunitaires et non-immunitaires. Les SPATEs induisent une diminution significative de l'activité du complément mais pas son inhibition totale, comme il a été montré pour EspP et Pic (39). Il est important de noter ici que les souches qui sécrètent les SPATEs ciblant les protéines du complément (EHEC, UPEC et *S. flexneri*) sont toutes les trois impliquées dans des bactériémies chez les patients (109–111).

Une inhibition partielle du système du complément peut également être un avantage pour *Shigella* puisque le C3b peut conduire à une perméabilisation de l'endothélium des vaisseaux sanguins. Nous pouvons émettre l'hypothèse que cette perméabilisation pourrait être une voie d'entrée pour *Shigella* dans la circulation sanguine, induisant ainsi la bactériémie.

4. Le passage de *Shigella* dans le sang et sa survie

Les mécanismes moléculaires impliqués dans le passage de *Shigella* dans le sang ne sont pas connus. On peut supposer qu'il y a soit une invasion directe des cellules endothéliales localisées dans la muqueuse colique, soit une destruction de l'endothélium. Ces mécanismes n'ont pas été étudiés durant ma thèse, mais seront discutés en fin de manuscrit. De façon sous-jacente, la question de l'oxygénation de ces zones reste entière, notamment en lien avec l'activation ou non du T3SS de *Shigella* et son rôle dans ce processus. De plus, il avait été montré qu'une SPATE, Sat, permet à *E. coli* EC701 (EAEC) de survivre dans le sérum humain comparé à la bactérie non pathogène *E. coli* DH5 α qui ne sécrète pas Sat (64). Ce résultat suggère ainsi la potentielle implication des SPATEs dans le processus de bactériémie et de survie de *Shigella* dans la muqueuse colique lors d'hémorragies.

Lors de ce projet de thèse, je me suis donc intéressée au rôle des SPATEs dans la capacité de *Shigella* à survivre à une exposition au plasma. Cette question a d'abord été adressée *in vitro* et a été recontextualisée *in vivo*. Ceci m'a amené à repenser le cycle de virulence de *Shigella* au cours de la shigellose, en identifiant notamment les phases d'exposition au plasma, qui ont lieu relativement tardivement lorsque sont induites une hémorragie locale ou une bactériémie.

III. La shigellose

1. Les manifestations cliniques

La shigellose ou dysenterie bacillaire est une pathologie causée par l'entérobactérie pathogène *Shigella*. Selon la connaissance scientifique actuelle, le seul hôte connu pour *Shigella* est l'homme. La période d'incubation de la bactérie est comprise entre 1 et 4 jours et les symptômes apparaissent en général entre 5 et 7 jours après l'infection. *Shigella* envahit spécifiquement la muqueuse du côlon et les symptômes cliniques majeurs se traduisent par des diarrhées sévères liquides, mucoïdes et parfois hémorragiques, des vomissements, de la fièvre, des crampes abdominales et une déshydratation pouvant mener à la mort du patient. Dans de plus rares cas, des complications peuvent apparaître, de manière systémique (méningite, bactériémie, hypoglycémie, mégacôlon toxique, arthrites, encéphalopathie, diarrhées persistantes, hyponatrémie sévère) ou locale (obstructions et perforations intestinales, prolapsus rectal) (112). Il a été constaté que les patients souffrant de shigellose présentaient des lésions endothéliales, associées à des hémorragies, à une congestion et à une dilatation des capillaires dans la muqueuse intestinale (90) (**Fig. 22**).

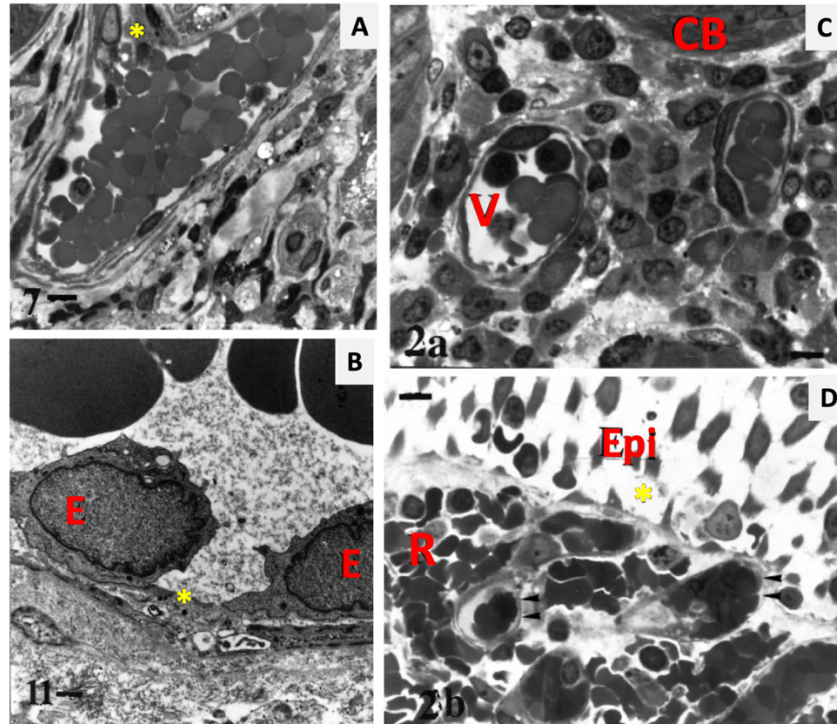


Figure 22 : Imagerie au microscope à transmission de congestion, dilatation et dommages des structures circulatoires présentes dans l'intestin d'un patient atteint de shigellose. (A) Imagerie d'une veinule à la base de la crypte. Le vaisseau est encombré de globules rouges stagnants. La paroi endothéliale présente des zones endommagées (astérisque jaune). Barre d'échelle : 8 μ m. **(B)** Veinule montrant une large ouverture à la jonction intercellulaire entre les cellules endothéliales (astérisque jaune). E, cellules endothéliales. Barre d'échelle : 1,5 μ m. **(C)** Imagerie de la microvascularisation de la muqueuse duodénale près de la base d'une crypte (CB). Les vaisseaux sont dilatés et congestionnés par des cellules sanguines stagnantes (V). Barre d'échelle : 8 μ m. **(D)** Imagerie de la vascularisation proche de l'épithélium de surface (Epi) du duodénum. Les capillaires (flèches) sont congestionnés. Il y a des zones d'ouverture vasculaire avec hémorragie. Les espaces intercellulaires entre les entérocytes sont nettement élargis (astérisque jaune) en raison de la maladie. R, GR dans l'espace périvasculaire. Barre d'échelle : 8 μ m. (Figures et légendes tirées et adaptées de Koshi *et al.* 2003 (90)).

La destruction des vaisseaux sanguins sous-épithéliaux et l'initiation d'hémorragies expliquent la présence de sang dans les diarrhées, symptômes classiques d'une shigellose sévère. Dans la muqueuse colique, la bactérie se trouve directement exposée à des composants du sang, comme des leucocytes, des neutrophiles, ou des protéines plasmatiques comme les composants du système du complément et certaines immunoglobulines. En effet, le sang est composé majoritairement de plasma (60%), de cellules sanguines, les hématies, qui transportent l'oxygène (40%), de globules blancs (lymphocytes, monocytes et granulocytes) ainsi que de plaquettes. Le plasma est composé majoritairement d'eau (92-

93%), de protéines (6-8%), et d'électrolytes et de nutriments (1%). Parmi les protéines retrouvées dans le plasma on retrouve majoritairement de l'albumine (50%), des immunoglobulines (IgG, A, M, E, D), du fibrinogène, des protéines du système du complément ainsi que le facteur B, du plasminogène, la protéine C, de l'AAT et d'autres éléments (**Fig. 23**).

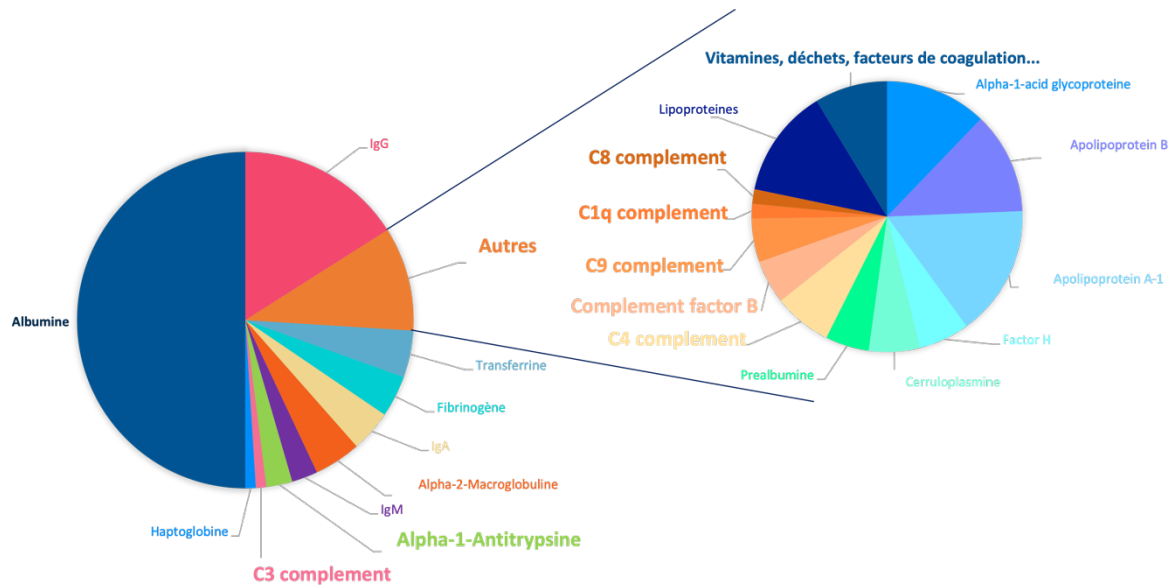


Figure 23 : Composition du plasma humain. (113)

Chaque année, des millions d'individus dans le monde sont affectés par la shigellose et des centaines de milliers de personnes en meurent (112, 114). Les principaux patients touchés par la shigellose sont les enfants âgés de moins de 5 ans, les patients malnutris (de tous âges) et les personnes immunodéprimées. En 2016, plus de 60 000 enfants de moins de 5 ans sont décédés de shigellose dans le monde (115). Cependant les patients immunocompétents peuvent également être infectés par *Shigella* comme les voyageurs, les hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (MSM) et les communautés de juifs-orthodoxes (116). Un rapport de l'Université du Maryland (USA) sur des prisonniers volontaires en bonne santé a permis de déterminer la dose infectieuse faible qui est comprise entre 10 et 500 bactéries faisant de la shigellose une maladie hautement contagieuse (117). En comparaison avec l'entéropathogène *Salmonella*, *Shigella* possède une grande capacité à survivre aux acides gastriques ce qui explique la dose infectieuse très faible (71). De plus, les modes de transmission de la bactérie sont nombreux, ce qui complique la mise en place de mesures pour contenir les épidémies.

2. Les modes de transmission aux seins des populations

La transmission de *Shigella* entre les hommes s'effectue de différentes manières. La faible dose infectieuse facilite la transmission par un simple contact direct Homme-Homme par la voie oro-fécale. Dans certains PED, les manques d'accès à l'eau potable et d'hygiène favorisent cette transmission. Ces conditions sanitaires défavorables sont notamment accentuées par un défaut de moyens dans des régions qui n'ont pas accès à des produits de soins basiques comme du savon ou de l'eau assainie. Il a également été observé, dans des pays développés comme le Royaume-Uni, les Etats-Unis, la France, la Belgique et l'Australie que des clusters pouvaient apparaître rapidement au sein des foyers et voisinages, des écoles, des cantines publiques ou au sein de communautés d'hommes homosexuels (118–122). Ceci démontre que, même dans des pays où les conditions d'hygiène sont développées, la capacité de transmission de *Shigella*, due à sa faible dose infectieuse, reste difficile à contrôler. En dehors des transmissions par contact direct, la bactérie peut s'acquérir lors de l'ingestion d'eau ou d'aliments souillés (123, 124). Il a également été démontré que les mouches peuvent être vecteurs de la bactérie et favoriser sa transmission (125, 126).

Les jeunes enfants sont les plus touchés par cette pathologie, notamment dans les PED, car ils mettent souvent les doigts à la bouche, en particulier dans les premiers mois de vie, accélérant ainsi la dissémination de la bactérie (115, 127). Le lavage des mains et des fruits et légumes est donc l'intervention la plus simple et la plus efficace pour lutter contre la transmission de la shigellose (128, 129). L'accès à l'eau potable devient primordial dans la lutte contre les clusters de *Shigella*. Par ailleurs, le développement et l'amélioration de lignes de traitement des eaux usées, l'accès à des structures sanitaires et médicales correctes pourraient fortement diminuer les cas de shigellose chaque année. D'ailleurs, dans les PED, *S. flexneri* est la souche qui est la plus isolée, tandis que *S. sonnei* est largement présente dans les pays développés.

3. L'épidémiologie

Parmi les cas de diarrhées qui sont rapportés chaque année dans le monde, environ 1,3 millions de patients sont affectés par la shigellose (130). Grâce aux progrès en matière de séquençage à haut débit et au génotypage des souches, il a été observé que la répartition des

souches de *Shigella* n'est pas uniforme dans le monde. En effet, les pays comme la République Centrafricaine, le Bangladesh, le Pakistan ou l'Inde, sont les plus touchés par *S. flexneri*, tandis que *S. sonnei* a émergé dans les pays dit « du Nord » et notamment en Europe (131). Le nombre de décès dû à la shigellose dans les pays développés est nettement réduit comparé aux PED du fait de l'accès aux hôpitaux, aux traitements et à une bonne qualité de soins. Dans les pays développés, une forte transmission se fait au sein des communautés d'hommes homosexuels (132). Dans les PED, les cas de shigellose sont clairement sous-estimés, du fait d'un accès extrêmement limité aux structures de santé et d'un manque de diagnostic efficace.

4. Le diagnostic

La première étape d'un bon diagnostic consiste en l'isolement et l'identification du micro-organisme impliqué dans l'infection. La coproculture est le test de diagnostic qui est le plus utilisé pour la shigellose. Cette méthode se base sur l'ensemencement sur des milieux généralement sélectifs de selles de patients infectés dans le but de rechercher des micro-organismes. Ce test doit être fait très rapidement, dans les 2 à 4h suivant le prélèvement, du fait de la sensibilité de *Shigella* aux variations environnementales (pH, température, dessiccation) (9). Cependant, dans les PED, un bon diagnostic de shigellose reste compliqué car la bonne conservation des échantillons de selles et l'accès au matériel de diagnostic restent limités, rendant également difficile le traitement rapide de la shigellose. De plus, la coproculture manque de sensibilité du fait de l'absence de méthode d'enrichissement et de la faible concentration de *Shigella* dans les selles du patient. Ces deux aspects entraînent une inhibition des *Shigella* qui seront très peu nombreuses face aux bactéries de la flore commensale lors des cultures sur gélose Hektoen (133). Dans une étude de 2022, la réanalyse de 673 échantillons de selles de patients du Bangladesh par PCR quantitative (*quantitative Polymerase Chain Reaction* ou qPCR) a montré que 50% des échantillons étaient positifs à *Shigella* contre environ 20% des échantillons avec la méthode de coproculture initialement utilisée (134). Une autre étude de 2017 a également montré que la méthode quantitative de PCR était beaucoup plus sensible pour la détection de *Shigella*, mais également des adénovirus, des ST-EPEC (*heat-stable enterotoxin-producing E. coli*) et de *C. jejuni*, qui ont largement été sous-estimés par la méthode de coproculture (135).

La méthode de qPCR est donc plus rapide et bien plus sensible pour la détection des *Shigella*. Cette méthode est utilisée depuis des dizaines d'années pour le diagnostic de la shigellose. Elle vise à amplifier des gènes codants pour des facteurs de virulence spécifiques à *Shigella*, comme *ipaH* et *ial* par exemple, après avoir extrait l'ADN bactérien total des selles de patient (CNR *E. coli* et *Shigella* – Rapport d'activité annuel 2008) (136). Il est important de noter ici, que ces deux gènes sont également présents chez les EIEC, ce qui rend impossible la différenciation de ces deux souches, si seule la méthode de PCR est utilisée pour le diagnostic. La méthode d'identification par qPCR nécessite l'accès à un laboratoire, du matériel spécifique onéreux et des personnels techniques formés, ce qui rend d'autant plus difficile le diagnostic rapide et qualitatif dans les zones les plus endémiques de shigellose. Pour pallier à ce problème, des tests de diagnostics rapides (TDR) ont été développés par des équipes de l'Institut Pasteur pour les souches *S. sonnei* (137), *S. flexneri* 2a (138) et *S. dysenteriae* 1 (139). Ces tests sont extrêmement utiles car ils sont très efficaces, très simples d'utilisation, fiables et la validation du diagnostic biologique est très rapide (en moins de 15 minutes). Ils sont basés sur une réaction antigène-anticorps sur une membrane de nitrocellulose par un principe d'immunochromatographie. Le principe est la détection de l'OAg du LPS de *Shigella* qui est spécifique selon les sérotypes.

Malgré l'avancée dans le domaine du diagnostic de la shigellose, les méthodes utilisées ne sont pas efficaces pour permettre une bonne surveillance mondiale de l'évolution des souches.

Récemment, la méthode de *core-genome multilocus sequence typing* (cgMLST) a été développée, elle est plus précise que les autres concernant le sérotypage des souches mais bien plus onéreuse (140). Cette méthode basée sur le séquençage de l'ADN permet de distinguer les souches pathogènes d'*E. coli* des souches de *Shigella* mais également de distinguer les sérotypes de *Shigella* au sein de la même espèce. Le séquençage du génome des souches reste la méthode la plus sensible pour identifier précisément l'agent pathogène et permet de surveiller la dispersion mondiale des infections par *Shigella* ainsi que l'évolution de la résistance aux antibiotiques des souches multirésistantes émergentes.

5. Les traitements

Particulièrement chez les enfants âgés de moins de 5 ans, en l'absence d'un bon diagnostic ou de traitement rapide, la shigellose peut conduire à des complications, notamment la bactériémie, et être fatale. Il est donc nécessaire d'intervenir rapidement, premièrement par une réhydratation du patient, par voie orale ou par une perfusion intraveineuse de solution saline (141). Une cure de zinc durant 10 jours est également recommandée chez les enfants atteints de diarrhées (10 mg de zinc par jour pendant 10 jours chez les enfants âgés de 2 mois ou moins) (142). Par ailleurs, un traitement avec des antibiotiques est également utile. Il est important de noter que leur utilisation doit se faire en parallèle de la réhydratation car ce traitement médicamenteux ne permet pas de pallier les pertes de fluides et d'électrolytes dues à la shigellose. La posologie du traitement antibiotique doit impérativement être respectée afin d'éviter l'émergence de souches multirésistantes. Selon la souche identifiée chez le patient et le résultat de l'antibiogramme, l'antibiotique choisi par les médecins doit être adapté. Il n'y a pas de traitement antibiotique universel pour lutter contre la shigellose. L'antibiotique de première ligne recommandé par l'OMS pour lutter contre *Shigella* est la ciprofloxacine à une dose de 15mg/kg/jour durant au moins 3 jours pour les cas de diarrhées modérées à sévères (143). L'azithromycine (10mg/kg/jour pour 3 jours) et le ceftriaxone (50-100mg/kg/jour pour 3-5 jours) sont des alternatives dites « de seconde ligne » également utilisées (144).

Depuis quelques années, de nombreuses souches de *Shigella* résistantes aux antibiotiques ont été observées dans le monde entier. *S. sonnei* est principalement concernée par sa multirésistance à la ciprofloxacine, le ceftriaxone et l'azithromycine (120). En effet, *S. sonnei* possède une grande capacité à acquérir des gènes de résistance antimicrobiens provenant des souches pathogènes ou non (*E. coli* par exemple) par transfert de gène horizontal (145).

6. La multirésistance aux antibiotiques

La multirésistance aux antibiotiques des pathogènes humains est devenue un problème majeur de santé publique. Dans les pays développés, la shigellose est traitée rapidement par l'utilisation d'antibiotiques et ne nécessite pas d'hospitalisation. Cependant en 2017, *Shigella* a été incluse par l'OMS dans la liste des « pathogènes prioritaires » pour lesquels la découverte

de nouveaux antibiotiques était urgente (Fig. 24) (84). Une souche de *S. sonnei* multirésistante (MDR/XDR *S. sonnei*) a rapidement émergée et s'est dispersée au sein de l'Europe en partie à cause des mouvements de voyageurs qui étaient porteurs de la bactérie mais également lors des relations sexuelles entre les Hommes (120, 122, 146). La résistance aux médicaments dits de première ligne tels que l'ampicilline ou le triméthoprime-sulfaméthoxazole a été observée pour de nombreuses souches de *Shigella* notamment en Iran (147) et au Mozambique (148) obligeant l'utilisation d'antibiotiques plus rares et bien plus coûteux tels que la ciprofloxacine de la famille des fluoroquinolones, l'azithromycine de la famille des macrolides et la ceftriaxone de la famille des céphalosporines (147). En 10 ans, la prévalence de la résistance à la tétracycline a augmenté de 10 fois sur une île Indienne (149). Les antibiotiques qui ne devraient pas être utilisés pour traiter la shigellose à cause de la forte présence de souches résistantes sont : l'ampicilline, le chloramphénicol, les tétracyclines, l'acide nalidixique, le nitrofurantoin, la gentamycine, les céphalosporines de 1^{ère} et 2nd générations, et l'amoxicilline (150).

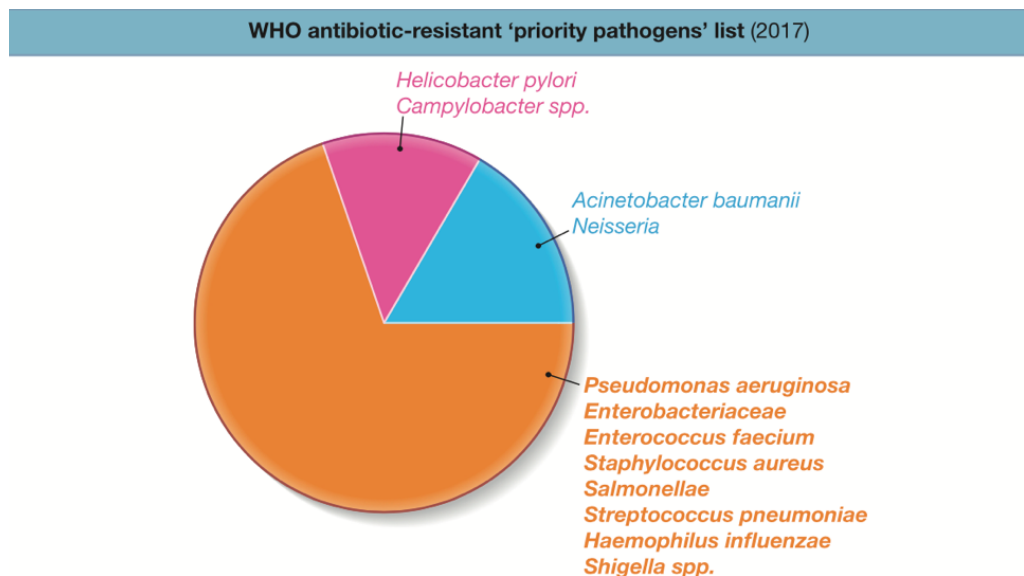


Figure 24 : Les pathogènes multirésistants aux antibiotiques classés dans la liste des pathogènes prioritaires de l'OMS. Les pathogènes en orange sont les anaérobies facultatifs, les pathogènes en bleu sont les pathogènes aérobies stricts et les pathogènes en rose sont les pathogènes microaérophiles (84). Le genre *Shigella* spp. est classé comme pathogène anaérobie facultatif.

Afin de minimiser l'émergence de souches multirésistantes, la prévention actuelle de la maladie repose essentiellement sur une amélioration de l'hygiène, ce qui reste compliqué

dans les régions très pauvres du monde où la shigellose est fortement présente. Seule la vaccination permettra de contrôler la maladie. Aucun vaccin n'est actuellement commercialisé, bien qu'un grand nombre de candidats-vaccins soient aujourd'hui en phase d'essais cliniques (151, 152).

7. Les vaccins

Depuis déjà une soixantaine d'années, des efforts sont mis en place pour développer un vaccin contre le genre *Shigella spp.* Les premiers vaccins développés sont des vaccins à base de souches atténuées. Ce sont des souches pour lesquelles de nombreux gènes codants pour des facteurs de virulence ont été mutés, notamment *set* (codant pour ShET1) ou encore *icsA* (aussi appelé *virG*) (permet la dispersion intra- et inter-cellulaire) et injectés aux volontaires comme dans l'étude menée par Coster et *al.* en 1999 avec une souche atténuée de *S. flexneri* 2a SC602 (153). Cependant, aucun vaccin à base de souches atténuées n'a été homologué.

Les stratégies vaccinales existantes restent limitées et ne sont pas efficaces car elles sont insuffisamment immunogéniques contre toutes les souches et sérotypes. En effet, il existe plus de 50 sérotypes de *Shigella*. L'objectif reste de développer un vaccin multivalent qui puisse apporter une protection contre plusieurs sérotypes et donc être beaucoup plus efficace. Pour l'instant, des vaccins monovalents ont été majoritairement développés, ils sont donc dits sérotypes-spécifiques. Bon nombre de vaccins à l'étude sont basés sur l'immunisation par l'OAg du LPS de *Shigella* qui est immunogénique (154, 155). Un vaccin bivalent pour *S. sonnei* et *S. flexneri* 2a basé sur leur OAg de LPS vient d'entrer dans la 3^{ème} phase d'essai clinique en Chine chez des enfants volontaires âgés de 6 mois à 5 ans (BZLB. NCT05156528 Efficacy, Immunogenicity and Safety of S. Flexneri 2a-S. Sonnei Bivalent Conjugate Vaccine in Volunteers Aged From 6 Months to 5 Years). Un autre vaccin, cette fois monovalent basé sur l'OAg du LPS de *S. sonnei* conjugué à la protéine exogène recombinante A de *P. aeruginosa* (*S. sonnei*-rEPA) est en phase 3 d'essai clinique en Israël. Les résultats ont montré une efficacité de protection de 71,1% chez les enfants âgés de 3-4 ans, 35,5% chez les 2-3 ans, mais il n'y a pas eu d'efficacité notable chez les enfants âgés de 1 à 2 ans (155). Chez des militaires israéliens (âgés de 18 à 22 ans), ce même vaccin (*S. sonnei*-rEPA) a été testé et a montré une efficacité de protection de 74% auprès des patients ayant été infectés naturellement par *S. sonnei* dans les 70-155 jours suivants l'injection du vaccin (154).

L'efficacité du vaccin augmente donc avec l'âge, mais les enfants les plus touchés et les plus vulnérables restent toujours non protégés contre la shigellose.

Certaines études mettent en évidence le rôle immunogénique de certaines protéines de surface de *Shigella* comme les protéines Ipa présentes à la pointe de l'appareil de sécrétion du T3SS (notamment IpaB) induisant alors une protection contre les infections futures (156, 157). Des études sont conduites actuellement sur le développement d'un vaccin appelé GMMA (*Generalized Modules for Membranes Antigens*) (158). Ce vaccin est basé sur l'injection chez les sujets de vésicules membranaires extracellulaires (OMV = *Outer Membrane Vesicles*) de *Shigella* artificiellement formées. Cette technologie nouvelle permet à la fois de présenter à l'immunité l'OAg, mais également les protéines de la surface de la bactérie qui peuvent être conservées chez la majorité des sérotypes des 4 espèces de *Shigella* (par exemple les Ipa ou IcsA).

Par ailleurs, la difficulté de développer un pan-vaccin contre la shigellose est dû au manque d'un modèle animal robuste.

8. Le modèle animal de la shigellose

Les souris conventionnelles ne sont pas sensibles à l'infection par *Shigella* pour une raison qui reste inconnue à ce jour. Dans la plupart des cas, l'animal ne montre pas de symptôme et retrouve sa santé initiale quelques jours après l'infection.

Récemment, notre équipe a développé et validé un modèle animal de cobaye carencé en ascorbate (159). Des femelles âgées de 3 semaines sont nourries pendant 2 semaines avec un régime spécifique contenant différentes concentrations d'ascorbate. Nous avons déterminé que les animaux carencés en ascorbate (10 mg ascorbate/kg) sont plus sensibles à la shigellose comparés à des animaux qui reçoivent une dose optimale d'ascorbate (400 mg ascorbate/kg) (**Fig. 25**). Les animaux carencés infectés par *S. flexneri* 5a perdent du poids après l'infection (**Fig. 25a**) et leur muqueuse colique est altérée (**Fig. 25b**). En revanche, les animaux carencés en ascorbate ne présentent pas de symptômes de scorbut comme originalement décrit par Lind en 1753 (160). Ce modèle animal nous permet donc de suivre des temps d'infection plus longs, et de suivre des mécanismes de virulence de la bactérie qui ne peuvent pas être perçus lors des temps courts d'infection. C'est le cas de la bactériémie.

En effet, la bactériémie induite par *Shigella* est l'une des complications qui peut être fatale pour le patient.

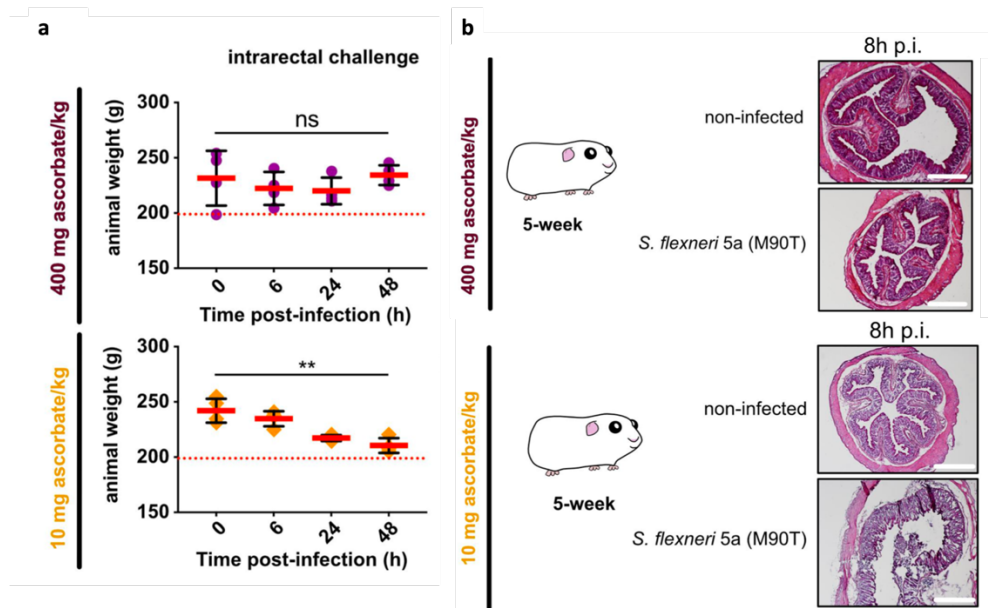


Figure 25 : Validation d'un modèle de cobaye carencé en ascorbate sensible à la shigellose. Des cobayes de 5 semaines carencés en ascorbate (10 mg d'ascorbate/kg d'alimentation) et des animaux témoins (400 mg d'ascorbate/kg d'alimentation) ont été infectés par voie intrarectale avec 10^{10} CFU de *S. flexneri* 5a pendant 8 h ou 48 h. **(a)** Perte de poids chez les cobayes infectés par voie intrarectale exprimée en moyenne \pm S.D., * indique un test-t $p < 0.05$, ** indique $p < 0.01$. **(b)** Les animaux ont été sacrifiés 8 heures après l'infection et des échantillons de côlon distal ont été prélevés, colorés à l'hématoxyline-éosine et comparés aux tissus non infectés. Les barres d'échelle sont de 30 mm. (Figures et légendes adaptées de Skerniskyte *et al.* 2023 (159)).

9. La bactériémie

a. Une infection du sang

La bactériémie correspond à la présence de bactéries vivantes dans la circulation sanguine. Cette infection du sang provoque un emballement du système immunitaire de l'hôte, qui se traduit par un dysfonctionnement des organes et une forte fièvre, mais peut parfois être asymptomatique. La bactériémie est associée à une forte mortalité. Chaque année environ 30 millions de cas de bactériémie sont reportés dans le monde entier et on estime 5,3 millions de morts due à cette infection du sang (161, 162). L'âge avancé, le très jeune âge, la prise d'immunosuppresseurs et les comorbidités, sont tous des facteurs à risque pour les infections du sang (163). *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermis*, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*),

Enterococcus faecium et *Acinetobacter baumannii* sont les 10 espèces les plus retrouvées dans les cas de bactériémie en 20 ans (entre 1997 et 2016) (164). Depuis toujours, *S. aureus* était la bactérie la plus isolée dans les infections nosocomiales et les bactériémies, étant donné son caractère opportuniste. Le *SENTRY Antimicrobial Surveillance Program* a estimé qu'*E. coli* est, depuis 2005, l'agent pathogène le plus prévalent dans les bactériémies (20% des bactériémies mondiales) (164).

b. La bactériémie à *E. coli*

Les souches d'UPEC et d'ExPEC sont très souvent la cause de bactériémie chez l'homme (94). UPEC va induire une infection aigüe du rein et de l'urètre (pyélonéphrite) puis, à un certain stade, rejoindre la circulation sanguine si l'infection n'est pas traitée à temps (165). C'est le tractus intestinal qui est colonisé par ExPEC, qui mobilise ses facteurs de virulence pour traverser la barrière endothéliale des vaisseaux sanguins par translocation ou par rupture mécanique (166). Pour ces deux bactéries, de nombreux facteurs de virulence entrent en jeu dans la colonisation et la survie au sein des vaisseaux sanguins. Chez UPEC, des adhésines, des toxines comme l'hémolysine, la capsule, les sidérophores, ou des protéines de survie dans le sérum sont nécessaires à la bactérie pour induire la bactériémie (**Fig. 26**) (167–169). Chez ExPEC, les gènes impliqués dans la colonisation et la survie dans le sang sont très similaires à ceux d'UPEC. Ce sont des gènes codants pour des protéines d'acquisition de fer, des adhésines, des protectines et des toxines (170). Il a également été mis en évidence par C. Freire et ses collaborateurs, que les SPATEs sont largement présentes dans les génomes des souches d'*E. coli* qui sont isolées des bactériémies (94). Une autre étude portant sur l'une de ces sérines protéase, Sat, décrite comme une toxine, a montré que celle-ci peut cliver des protéines de la cascade du complément bloquant ainsi les trois voies de celui-ci et *in-fine* permet à ExPEC de survivre dans le sang et de se disséminer (64).

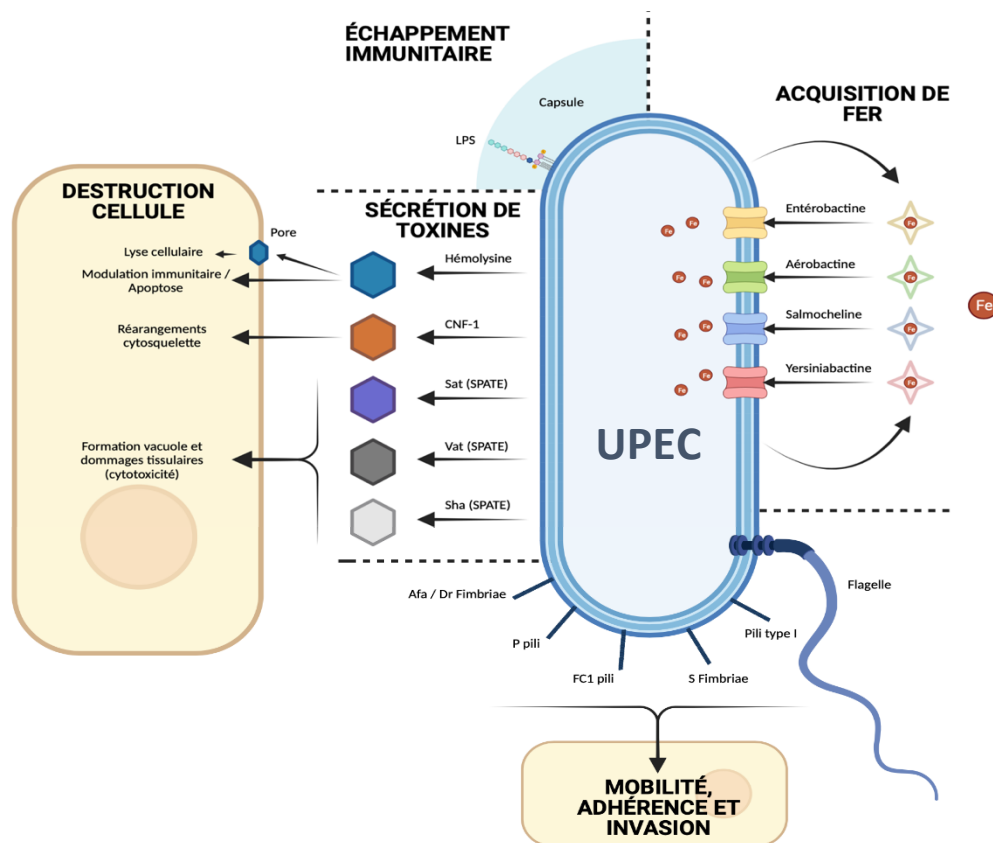


Figure 26 : Facteurs de virulence nécessaires à UPEC pour coloniser les vaisseaux sanguins, survivre et se disséminer dans la circulation sanguine. (A gauche) UPEC possède des systèmes d'acquisition du fer comme l'entérobactine et la salmocheline. (A droite) Les souches d'UPEC sécrètent des toxines qui perturbent le cytosquelette, les réponses inflammatoires et les voies de survie conduisant à la lyse cellulaire. Les effets de l'intoxication des cellules hôtes par l'alpha-hémolysine (HlyA), des protéase sécrétée (Sat, Vat et Sha) et le facteur nécrosant cytotoxique 1 (CNF-1) sont indiqués ici. (En bas) UPEC peut se lier aux cellules et aux tissus de l'hôte grâce à des adhésines. Il s'agit notamment des adhésines Afa/Dr, des S fimbriae, des F1C pili, des pili de type 1 et des pili P. (En haut) UPEC sécrète une capsule qui lui permet de camoufler son LPS afin de ne pas être reconnu par le système immunitaire de l'hôte lors de l'infection. (Figure et légende adaptée de (168, 169)).

c. La bactériémie à *Shigella*

La shigellose est une pathologie qui se limite normalement à une colonisation de l'intestin. Il arrive que des complications extra-intestinales apparaissent, comme des encéphalopathies, des HUS, des atteintes du foie et des bactériémies. La bactériémie à *Shigella* (ou shigellemia) est rarement décrite dans la littérature car elle est considérée comme une complication rare de la shigellose. La capacité des *Shigella* à atteindre la circulation sanguine et à provoquer une bactériémie augmente considérablement le taux de mortalité chez les patients atteints

de shigellose, en particulier chez les jeunes enfants souffrant de malnutrition aiguë sévère (171, 172). L'étude de Berkley sur des enfants âgés de moins de 5 ans au Kenya a mis en évidence des bactériémies à *Shigella*, qui sont cependant moindres, comparées aux bactériémies provoquées par *S. pneumoniae*, *Salmonella* ou *E. coli* (**Fig. 27**) (173). Il est à noter dans cette étude que les colonisateurs bactériens majeurs du sang sont les bactéries anaérobies facultatives (**Fig. 27** - en orange). En effet leur capacité à s'adapter et vivre dans diverses conditions d'oxygénation leur apporte un avantage considérable pour survivre au sein de l'hôte. Les nouveau-nés, les jeunes enfants âgés de moins de 5 ans, les personnes âgées, les personnes malnutries, immunodéprimées ou atteintes de maladies sexuellement transmissibles (comme le Virus de l'Immunodéficience Humaine - VIH), les patients atteints de maladies chroniques comme le cancer, le diabète ou l'hypertension, les patients ayant subi des transplantations d'organes (rein notamment) et ceux victimes de multiples infections restent les plus touchés par la bactériémie à *Shigella* (**Fig. 28**). Selon les études des 50 dernières années, *S. flexneri* est la plus répandue dans les cas de shigellemia, suivi par *S. sonnei* (174). Une étude conduite en Georgie (USA) entre 2002 et 2012 sur 11 262 patients ayant la shigellose a mis en évidence que moins d'1% des patients présentaient une bactériémie (0,66%). Il est important de noter ici que 50% des patients ayant une bactériémie à *Shigella* étaient également positifs pour le VIH. Dans la **figure 28** est résumé un grand nombre d'études de cas de bactériémie à *Shigella* entre 1978 et 2023. En prenant en compte ces données, 463 cas de shigellemia ont été référencés ici ; 141 patients sont décédés, portant le taux de mortalité à 30,5%. Ce taux de mortalité semble être corrélé aux taux de mortalité liés à la bactériémie qui varient généralement entre 20 et 40% (175).

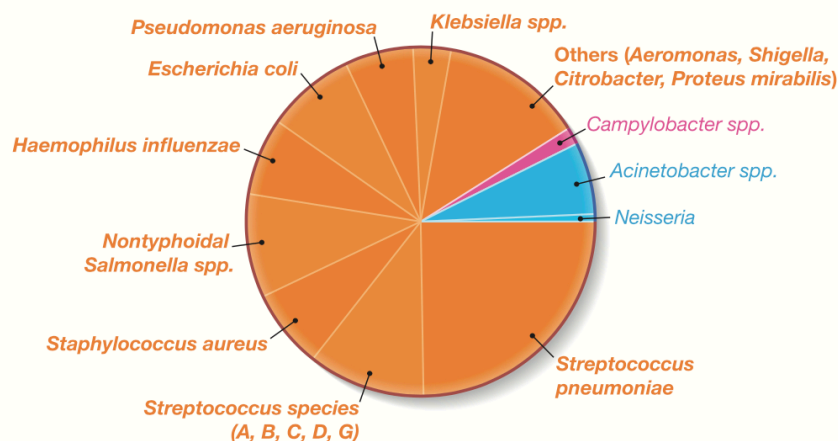


Figure 27 : Répartition des souches isolées du sang chez des enfants de moins de 5 ans ayant une bactériémie au Kenya entre 1998 et 2002. Les souches en orange représentent les anaérobies facultatifs, les souches en bleu sont les aérobies strictes et les souches en rose sont les microaérophiles (84, 173).

L'incidence de la shigellemia est largement sous-estimée pour plusieurs raisons. En 2022, plus de 5 millions d'enfants sont décédés avant d'atteindre l'âge de 5 ans, ainsi que 2,1 millions d'enfants et adolescents âgés de 5 à 24 ans (176). Dans les régions les plus touchées par cette mortalité infantile (notamment l'Afrique Subsaharienne), la cause de la mort est très rarement identifiée car les enfants ne sont que très rarement pris en charge par des centres de soins. Les cas de bactériémie à *Shigella* sont donc très probablement sous-estimés dans les données épidémiologiques. Par ailleurs, le diagnostic de la shigellose se fait par l'analyse des selles du patients. Dans la majorité des cas, les patients sont testés positifs à la *Shigella* par coproculture sans recherche du pathogène dans le sang. Une étude de 1987 avait déjà mis en évidence que chez certains patients, des souches de *Shigella* ont été isolées dans le sang mais pas dans les selles (177). Il serait important de faire systématiquement une analyse de selle et de sang chez les patients montrant des symptômes de shigellose, afin d'identifier la bactériémie et de traiter au plus vite. Par ailleurs, il reste encore compliqué de distinguer la nature de certains isolats de *E. coli* et *Shigella spp* en ne se basant uniquement que sur les caractéristiques biochimiques. Il serait donc nécessaire de pousser l'identification avec des méthodes moléculaires comme le séquençage de l'ARN ribosomique 16S ou en analysant la signature protéomique par spectrométrie de masse. Cependant l'accès à ces méthodes moléculaires est rarement possible dans les zones les plus reculées et pauvres dans lesquelles la shigellose est la plus prévalente. Nous pouvons donc légitimement supposer que la

bactériémie à *Shigella* est sous-diagnostiquée, puisque des analyses incomplètes peuvent conduire très facilement à un diagnostic de bactériémie à *E. coli* et non à une shigellemia.

Number of cases	Strains (prevalence in %)	Mortality rate	Risk factors	Study reports
23	<i>S. flexneri</i> (78) <i>S. sonnei</i> (13) <i>S. dysenteriae</i> (9)	21 deaths 91%	Neonate, < 2-year-old, liver cirrhosis, renal tubular necrosis, kwashiorkor, marasmus, bronchopneumonia, <i>Salmonella</i> infection, typhoid	Hallett & Scragg, 1978 (178)
2	<i>S. flexneri</i> (100)	0 death 0%	< 3-year-old	De Mol et al, 1981 (179)
1	<i>S. sonnei</i> (100)	1 death 100%	/	O'Connor and O'Callaghan, 1981 (180)
8	Unknown	4 deaths 50%	Malnourishment, low serum albumin level, infected with ampicillin-resistant strains, leukopenia	Duncan et al, 1981 (181)
111	<i>S. flexneri</i> (53) <i>S. sonnei</i> (29) <i>S. dysenteriae</i> (17) <i>S. boydii</i> (1)	33 deaths 30%	Noenates, newborns, hepatitis, diabetes, meningitis, kwashiorkor, pneumonia, typhoid, marasmus, acute monocytic leukemia, renal failure, malnourishment, cirrhosis	Kligler and Hoeprich, 1984 (182)
82	<i>S. flexneri</i> (46) <i>S. dysenteriae</i> (44) <i>S. sonnei</i> (6) <i>S. boydii</i> (4)	17 deaths 21%	19,5% children < 5-year-old, malnourishment	Struelens et al, 1985 (183)
1	<i>S. flexneri</i> (100)	1 death 100%	Chronic lymphocytic leukemia, <i>P. aeruginosa</i> infection	Qadri et al, 1987 (184)
27	<i>S. flexneri</i> (41) <i>S. sonnei</i> (33) <i>S. boydii</i> (4) <i>S. dysenteriae</i> (4) Unknown (18)	7 deaths 26%	Old age, malnourishment, diabetes, renal transplantation, autoimmune disease, B hepatitis	Morduchowicz et al, 1987 (177)
1	<i>S. dysenteriae</i> (100)	0 death 0%	HIV-infected, Kaponi sarcoma, cerebral toxoplasmosis	Huebner et al, 1993 (185)

4	<i>S. dysenteriae</i> (75) <i>S. flexneri</i> (25)	3 deaths 1 N/A 75%	All < 3-year-old	Saraswathi et al, 2002 (186)
1	<i>S. flexneri</i> (100)	0 death 0%	7-month-old	Yen et al, 2003 (187)
15	<i>S. flexneri</i> (87) <i>S. sonnei</i> (7) <i>S. boydii</i> (6)	0 death 0%	Mean age = 20,5 months	Greenberg et al. 2003 (188)
1	<i>S. sonnei</i> (100)	0 death 0%	<i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , and <i>P. aeruginosa</i> infections during childhood	Chapel et al. 2005 (189)
1	<i>S. dysenteriae</i> (100)	1 death 100%	6-month-old	Erqou et al, 2007 (190)
9	<i>S. sonnei</i> (100)	2 deaths 22%	Adults, renal transplant, diabetes, alcoholic liver disease, HIV/AIDS, breast cancer, malnourishment	Hawkins et al, 2007 (191)
34	<i>S. flexneri</i> (88) <i>S. sonnei</i> (9) <i>S. boydii</i> (3)	7 deaths 21%	< 5-year-old, HIV, tuberculosis, malnourishment, hypertension, chronic renal failure	Davies & Karstaedt, 2008 (192)
1	<i>S. sonnei</i> (100)	1 death 100%	Lung cancer, myocardial infarction	Liu et al, 2009 (193)
1	<i>S. flexneri</i> (100)	0 death 0%	Hypertension, chronic kidney disease, dilated cardiomyopathy, permanent pacemaker device	Sharma & Arora, 2012 (194)
1	<i>S. flexneri</i> (100)	1 death 100%	6-month-old, malnourishment	Jain et al, 2014 (195)
23	<i>S. dysenteriae</i> (61) <i>S. flexneri</i> (35) <i>S. sonnei</i> (4)	20 deaths 86%	Post renal transplant, anemia, marasmus, chronic disease, renal failure, post measles	Appannanavar et al, 2014 (196)
1	<i>S. sonnei</i> (100)	0 death 0%	Gastric bypass	Shogbesan et al. 2017 (197)
27	<i>S. dysenteriae</i> (50) <i>S. flexneri</i> (43) <i>S. sonnei</i> (7)	20 deaths 74%	< 5-year-old, diabetes, malnourishment, anemia, marasmus, post measles, chronic disease, renal failure.	Nayyar et al, 2017 (198)

2	<i>S. flexneri</i> (100)	0 death 0%	< 1-year-old	Delgado et al. 2018 (199)
72	<i>S. flexneri</i> (50) <i>S. sonnei</i> (50)	2 deaths 2,7%	HIV/AIDS (37 patients)	Tobin-D'Angelo et al. 2020 (174)
1	<i>S. sonnei</i> (100)	0 death 0%	Cystic fibrosis, exocrine pancreatic insufficiency, bilateral bronchiectasis, repeated respiratory infections	Carretero-Vicario et al. 2020 (200)
1	<i>S. flexneri</i> (100)	0 death 0%	Diabetes	Rotramel & Zamir. 2021 (201)
1	<i>Shigella spp.</i> (100)	0 death 0%	< 5-year-old	Khan et al. 2023 (202)
11	<i>S. sonnei</i> (100)	0 death 0%	HIV, immunocompromising conditions, liver disease, pulmonary disease, cardiac disease, chronic renal disease	Stefanovic et al, 2023 (203)
Total		Mortality		
463		rate = 141		
		(30,5%)		

Figure 28 : Tableau récapitulatif des études de cas de bactériémie à *Shigella* entre 1978 et 2023.

Objectifs de la thèse

La shigellose est une maladie contagieuse, qui provoque la mort de nombreuses personnes et notamment les enfants âgés de moins de 5 ans dans les pays en développement et les personnes immunodéprimées. Le manque d'accès à l'hygiène et aux soins dans les régions endémiques, la multirésistance aux antibiotiques des souches de *Shigella* et l'absence de vaccin homologué font de la shigellose un problème majeur de santé publique. De plus la diarrhée hémorragique est un des symptômes caractéristiques de la shigellose provoquée par des lésions endothéliales associée à des hémorragies locales dans la muqueuse colique. Cependant, l'impact de la présence de composants plasmatiques à forte activité antimicrobienne dans la muqueuse colique sur la survie des *Shigella* n'a pas été étudié. De plus, les *Shigella* sont encore bien plus exposées au plasma pendant la bactériémie, qui survient dans la plupart des cas graves de shigellose et qui est largement sous-estimée, voire oubliée.

Le laboratoire dont je fais partie caractérise depuis plusieurs années les différentes étapes du cycle de virulence de *Shigella*, dans le but de proposer de nouvelles approches thérapeutiques et prophylactiques.

L'objectif de mon projet de thèse est de mieux comprendre le rôle des SPATEs dans la virulence de *Shigella*. En effet, le T3SS est essentiel à l'initiation du processus infectieux (invasion de l'épithélium colique). En revanche, il a été mis en évidence que ce système de sécrétion devenait inactif au sein des tissus infectés où la concentration en oxygène est faible (foyers hypoxiques). Nous avons donc formulé l'hypothèse que dans ces conditions la sécrétion des SPATEs pouvait jouer un rôle alternatif au T3SS, permettant à *Shigella* de survivre dans le tissu et poursuivre sa dissémination.

Je me suis donc intéressée à la régulation de la sécrétion des SPATEs par différents paramètres environnementaux dont la température et l'oxygène. J'ai par ailleurs développé tous les outils et méthodes nécessaires à l'étude de ces facteurs de virulence (souches mutantes, protéines purifiées, anticorps spécifiques) qui ont permis d'initier leur étude *in vitro* et *in vivo*. Il a été montré chez des souches d'*E. coli* pathogènes et chez *S. flexneri* que les SPATEs sont majoritairement impliquées dans des processus d'invasion cellulaire et de modulation du système immunitaire. Cependant, l'implication de ces protéases dans le cycle infectieux de *Shigella* est encore assez peu documentée. Cela m'a amenée à rechercher les

étapes du cycle de virulence au cours desquelles les SPATEs pouvaient être essentielles. Grâce au développement d'un nouveau modèle animal de shigellose (le cobaye carencé en ascorbate) permettant de suivre les étapes précoces et tardives du processus infectieux, j'ai pu mettre en évidence l'importance des SPATEs dans la capacité de *Shigella* à survivre à l'exposition au plasma, dans les tissus hémorragiques mais aussi dans la circulation sanguine, au cours de la bactériémie.

Mes résultats sont présentés dans l'article 1, disponible également sur BioRxiv, suivi d'une discussion et de résultats supplémentaires non publiés. J'ai par ailleurs contribué à la rédaction d'une revue et à une étude réalisée en collaboration, ces deux manuscrits sont présentés en Annexe.

Résultats

Article 1 : SPATEs promote the survival of *Shigella* to the plasma complement system upon hemorrhage and bacteremia

Introduction

Ce manuscrit est né de l'étude initiale du rôle des SPATEs dans le cycle de virulence de *Shigella*. Cela nous a amenés à faire des observations originales importantes qui ont permis de mettre en lumière de nouveaux mécanismes de virulence de *Shigella*, mais aussi de nouveaux aspects de la physiopathologie de la shigellose, qui pourront être probablement étendus aux autres infections bactériennes. Cette étude a été réalisée sur les souches *S. flexneri* 5a et *S. sonnei*, ces deux pathogènes ne sécrétant qu'une seule protéine de la famille des SPATEs.

Le projet a été initié par la construction des souches mutantes *S. flexneri* 5a Δ sepA et *S. sonnei* Δ sigA et des souches complémentées, par l'optimisation des conditions de purification de SepA et de SigA et enfin par la production d'anticorps spécifiques de ces SPATEs.

L'observation originale que nous avons réalisée au début de ce projet a été la capacité de SepA et de SigA de cliver le composant 3 du complément (C3) *in vitro*, que ce soit en utilisant du plasma humain ou de la protéine C3 humaine pure. Cette observation se rapprochait de ce qu'il avait été démontré pour Pic (sécrétée par *S. flexneri* 2a, EAEC, UPEC et STEC) possédant la propriété de cliver C3, ainsi que d'autres composants de la cascade du complément, inactivant *in-fine* ce système. Toutefois, notre observation suggérait que *Shigella* avait la capacité de survivre à l'exposition au plasma, malgré l'activation de la cascade du complément. Ce point précis et ses conséquences physiopathologiques n'avaient jusque-là pas été considérés ni étudiés au cours du processus infectieux de *Shigella*.

Nous avons ainsi pu démontrer que toutes les souches de *Shigella* testées survivent et se divisent en présence de plasma humain *in vitro*, à la différence de souches non-pathogènes d'*E. coli* par exemple qui subit une lyse rapide. Nous avons pu confirmer, par l'analyse phénotypique des mutants *S. flexneri* 5a Δ sepA et *S. sonnei* Δ sigA, le rôle clé joué par les SPATEs (SepA et SigA) dans la capacité de *Shigella* à bloquer l'activation de la cascade du complément *in vitro*.

Si l'exposition de *Shigella* au système du complément était attendue lors de bactériémie, cela n'avait jusque-là pas été montré dans un modèle animal de shigellose. L'équipe venait de caractériser et valider un nouveau modèle de cobaye carencé en ascorbate dans lequel les infections par *Shigella* entraînaient des symptômes de shigellose plus marqués et prolongés,

et dans lequel la bactériémie était rapportée. Nous avons donc évalué l'impact des SPATEs de *S. flexneri* 5a et de *S. sonnei* dans ce modèle. Trois observations originales majeures ont été réalisées dans cette partie :

- *S. sonnei* et *S. flexneri* 5a sont capables d'atteindre et de coloniser les vaisseaux sanguins (CD31+/CD34+) dans la muqueuse colique, de provoquer des hémorragies au niveau des abcès et d'induire une bactériémie.
- L'exposition de *Shigella* au système du complément, mais aussi aux autres composants du plasma, a lieu localement lors de sa dissémination au sein du tissu hémorragique et de façon systémique au cours de la bactériémie.
- La résistance de *Shigella* au système du complément, médié par les SPATEs et indépendamment du niveau d'oxygène, est essentielle à sa capacité de dissémination au sein de la muqueuse colique et de propagation dans la circulation sanguine.

SPATEs promote the survival of *Shigella* to the plasma complement system upon local hemorrhage and bacteremia

Lorine Debande^a, Ahmad Sabbah^a, Laurianne Kuhn^b, Patryk Ngondo^a, Antonin C André^a, Béatrice Roche^a, Matthieu Laborde^a, Victoria Cantalapiedra-Mateo^a, Tamou Thahouly^a, Ana Milinski^c, Laurent Bianchetti^c, Christine Allmang-Cura^a, Magali Frugier^a, Benoit S Marteyn^{a,d,e,1}

^aUniversité de Strasbourg, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC), Architecture et Réactivité de l'ARN, CNRS UPR9002, F-67000 Strasbourg, France CNRS - UPR 9002, Strasbourg, France

^bPlateforme protéomique Strasbourg Esplanade FRC1589 du CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

^cUniversité de Strasbourg, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM U1258, CNRS UMR7104, 67404 Illkirch, France.

^dInstitut Pasteur, INSERM U1225, Unité de Pathogénèse des Infections Vasculaires, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

^eUniversity of Strasbourg Institute for Advanced Study (USIAS), Strasbourg, France.

¹To whom correspondence may be addressed. Email: marteyn@unistra.fr or marteyn@pasteur.fr

Author Contributions: B.S.M. designed research L.D., A.S., L.K., A.A., M.L., V.C.M., C.A.C, and B.S.M. performed research, A.M., L.B., B.S.M., P.N. and M.F. analyzed data, L.D. and B.S.M. wrote the paper.

Competing Interest Statement: The authors declare no competing interest.

Keywords: *Shigella*, hemorrhage, bacteremia, complement system, SPATE

Abstract

Shigella spp. are the causative agents of shigellosis, which remains a leading cause of death in children under the age of five. Shigellosis is characterized by fever and results in hemorrhagic diarrhea; in more severe cases, *Shigella* bacteremia has been reported. These clinical features strongly suggest that *Shigella* survive exposure to plasma, although this has not yet been studied at the molecular level. In this report, we confirmed in a guinea pig model of shigellosis that local hemorrhages were induced by *S. flexneri* 5a and *S. sonnei*, and we demonstrated that *Shigella* reached mucosal CD31+/CD34+ blood vessels during the late stages of infection and further disseminated in the bloodstream. These results confirmed the exposure of *Shigella* to plasma components within the hemorrhagic colonic mucosa and in the bloodstream. We demonstrated that all the tested *Shigella* strains survived plasma exposure *in vitro*, and we showed that Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs) are essential for *Shigella* dissemination within the colonic mucosa. We have confirmed that SPATEs are expressed and secreted in poorly oxygenated environments encountered by *Shigella* from hypoxic foci of infection to the bloodstream. We further demonstrated that SPATEs promoted *Shigella* survival in plasma, by cleaving complement component 3 (C3), thereby impairing complement system activation. We have shown here that the ability of *Shigella* to survive plasma exposure is a key factor in its virulence, both within primary foci and systemically.

Significance Statement

In this study we aimed to better understand the significance of the ability of *Shigella* to survive plasma exposure, as we observed that non-pathogenic *E. coli* rapidly lysed upon exposure. Indeed, we reported that *Shigella* was already exposed to plasma components within the colonic mucosa, as we reported in a guinea pig model of shigellosis that hemorrhages were induced, that were associated with local diffusion of plasma components in the infected colonic mucosa. *Shigella* was obviously exposed to plasma during bacteremia. The ability of *Shigella* to survive in plasma has not been previously reported. Here we have shown, first, that *Shigella* was able to divide and grow in the presence of human plasma, and second, we found that SPATEs played a central role in this process by impairing with the activation of the complement system.

Introduction

Shigellosis, or bacillary dysentery, is caused by *Shigella* spp., a genus of pathogenic enterobacteria that specifically infect and colonize the human colon. Four species of *Shigella* have been identified: *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, and *S. boydii*. Millions of cases of shigellosis are still reported worldwide each year, resulting in hundreds of thousands of deaths in developing countries (1-4). Symptoms of shigellosis include severe hemorrhagic diarrhea, vomiting, fever, abdominal pain and dehydration. Evidence of bloody and mucoid diarrhea in shigellosis patients is caused by local hemorrhage within the colonic mucosa, associated with endothelial damage. This clinical aspect of shigellosis has long been recognized, but the impact of the presence of plasma components with strong antimicrobial activity within the colonic mucosa on *Shigella* survival has not been studied. In addition, *Shigella* are further exposed to plasma during bacteremia, which occurs in most severe cases of shigellosis (2), especially in children under five years of age (3–6) and in immunocompromised or cancer patients (7–9). All species of *Shigella* can cause bacteremia to the same extent (*S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. boydii* and *S. dysenteriae*) (10). The ability of *Shigella* to reach the bloodstream and cause bacteremia significantly increases the mortality rate in shigellosis patients (11, 12). Patients suffering from shigellosis have been found to have endothelial damage, associated with hemorrhage, congestion and dilation of capillaries in the intestinal mucosa (13).

Therefore, we hypothesized that the ability of *Shigella* to survive exposure to plasma components, both locally during hemorrhage and systemically, contributes to its virulence and may play a central role in shigellosis. The virulence of *Shigella* relies on the expression of two major secretion systems that are conserved among *Shigella* strains: the type III secretion system (T3SS), which is involved in host cell invasion, and the type V secretion system (T5SS). The major T5SS virulence factors secreted by *Shigella* strains belong to the serine protease autotransporter of *Enterobacteriaceae* (SPATE) family. SPATEs consist of two domains: a transmembrane β -barrel domain and a passenger domain, the latter being secreted upon autocleavage within the linker sequence. Two classes (I & II) of SPATEs have been defined according to their structure and properties (14). Like all pathogenic *E. coli* strains, all virulent *Shigella* species secrete at least one member of the SPATE family; they are the most abundant virulence factors released by *Shigella* strains. *S. flexneri* 5a secretes SepA (class II), *S. sonnei* secretes SigA, *S. flexneri* 2a secretes SepA, SigA, and Pic (class II). SepA was the first *Shigella* SPATE to be identified (15).

Local hemorrhage and bacteremia are induced at late stages of *Shigella* infection, which until recently could not be studied in available animal models of shigellosis, because mice are not susceptible to *Shigella* infection and young guinea pigs are only transiently infected by *Shigella* (16). Our team recently validated a new ascorbate-deficient guinea pig as a model for shigellosis which allows to follow prolonged *Shigella* infections (17). In this model, we reported that *S. flexneri* 5a 48h infection induced bacteremia, whereas the molecular mechanisms remained elusive. In this study, we aimed to investigate the contribution of *Shigella* secretion systems in the late phase of infection, especially when *Shigella* is exposed to plasma components during both local hemorrhage and bacteremia.

We have previously shown that *Shigella* forms hypoxic foci of infection during the invasion and colonization of the colonic mucosa, and develops mainly under low-oxygen conditions in the late stages of infection (18), including during bacteremia, as we reported that the blood plasma is poorly oxygenated ($pO_2 = 8.4$ mmHg) (19). We have previously shown that the T3SS is inactive in the absence of oxygen (18, 20), and we hypothesized that the ability of *Shigella* to secrete virulence factors belonging to the T5SS may be involved in its ability to disseminate in the host at later stages of the infectious process. The contribution of SPATEs to the virulence of *Shigella* is far from fully understood, although some specific targets have been identified. It has been previously reported that Pic degrades O-glycosylated proteins on the surface of leukocytes (21), whereas SepA cleaves neutrophil alpha-1 antitrypsin (22). Pic has previously been reported to cleave complement component C3 *in vitro* (23), suggesting that SPATEs may impair activation of the complement

system and maintain the ability of *Shigella* to survive in plasma, although no direct evidence has yet been presented.

In this study, we confirmed that *S. flexneri* 5a and *S. sonnei* induce hemorrhage and reach blood vessels located in the colonic mucosa after prolonged infection. We demonstrated that all the tested *Shigella* strains survive plasma exposure, in contrast to non-pathogenic *E. coli*. We have also shown that the survival of *S. flexneri* 5a and *S. sonnei* depends on the secretion of SepA and SigA, respectively, which both cleave the complement C3, as previously reported for Pic (23). We found that SPATE-dependent cleavage of C3 impairs the formation of the complement membrane attack complex (MAC) (24), and we provided further evidence that SPATEs are essential *in vivo* for the dissemination of *Shigella* in the hemorrhagic colonic mucosa and in the bloodstream during bacteremia, revealing a novel function of SPATEs in the virulence cycle of *Shigella*.

Results

***Shigella* spp. induce hemorrhage, reach blood vessels, and survive the plasma exposure.**

To evaluate the occurrence of the interaction between *Shigella* and plasma components during the infectious process, we first analyzed the infected colonic mucosa of ascorbate-deficient guinea pigs (17) after prolonged infection. We first confirmed that hemorrhage was induced 48h p.i. in abscesses formed by *S. flexneri* 5a and *S. sonnei*, as revealed by the detection of red blood cells (RBCs), which were not observed in uninfected tissues (Fig. 1A). These results are consistent with previous observations made in the human intestine of patients with shigellosis (13). In this princeps study, in addition to hemorrhage, the authors reported endothelial damage associated with shigellosis, possibly associated with peripheral vascular insufficiency. We report here for the first time that *S. flexneri* 5a and *S. sonnei* reached CD31+/CD34+ blood vessels (Fig. 1B). More specifically, most *Shigella* infectious foci detected in the colonic mucosa colocalized with blood vessels that appeared largely disorganized (Fig. 1B). It has been suggested that this ability of *Shigella* to reach blood vessels is related to bacteremia, as reported previously (25). Detection of hemorrhagic abscesses in colonic mucosa infected by *Shigella* and its detection in blood vessels confirmed exposure to plasma components in colonic mucosa.

We further investigated the capacity of *Shigella* to survive and grow in the presence of plasma using M9 agar pad devices, that allowed bacterial growth to be monitored at the single cell level (Fig. S1A). We demonstrated that all tested *Shigella* strains (*S. flexneri* 5a, *S. flexneri* 2a, and *S. sonnei*) were able to survive and grow in the presence of human plasma, in contrast to non-pathogenic *E. coli* K12 which appeared to be lysed at early time points (Fig. 1C-D). As a control, we confirmed that all strains grew at the same rate in the absence of plasma (Fig. S1B-C). When all *Shigella* strains grew in the presence of plasma, we noted a significant reduction in bacterial growth rate in the presence of plasma compared to PBS, particularly at later time points (18h) (Fig. S1D), suggesting that the ability of *Shigella* to survive plasma exposure was associated with an active virulence mechanism; plasma exposure represented a stress to which *Shigella* had to respond to.

In addition, we aimed to identify the molecular mechanisms involved in the survival of *Shigella* upon plasma exposure. We have previously shown that plasma is poorly oxygenated (19) and that *Shigella* develops mainly under low-oxygen conditions within foci of infection (18). Under these conditions, we have shown that *Shigella* T3SS is inactive (20). Alternatively, we hypothesized that *Shigella* SPATEs might be involved in the ability of *Shigella* to survive in plasma, because Pic has previously been reported to target plasma component C3 (23).

***Shigella* SPATEs: structure and regulation of their expression/secretion**

SigA, SepA, and Pic are the only SPATEs secreted by *Shigella* species. We confirmed by mass spectrometry analysis of bacterial cultures that *S. sonnei* secretes only SigA, *S. flexneri* 5a secretes

only SepA and *S. flexneri* 2a secretes SigA, SepA and Pic (Fig. 2A). Since only partial information were available on the structure, secretion, and expression regulation of SPATE, we provided additional missing data during this study.

The structure of the passenger domain of SepA was previously solved by X-ray crystallography (Q8VSL2 (Uniprot) or 5J44 (PDB)) (26) (Fig. 2B). The structure of the passenger domain of Pic (Q54151 (Uniprot)) (Fig. 2B) was solved using the structure prediction tool AlphaFold (27, 28), which allows 3D structure prediction starting from primary sequence information. Since the 3D model of the passenger domain of *S. sonnei* SigA was not available, we obtained its molecular model (Uniprot-ID:Q3YXF8 from residue Met56 to Asn1008) using the structure prediction tool AlphaFold and ColabFold (29), a Web-interfaced implementation of AlphaFold 2. Five models were generated and ranked based on mean pLDDT quality scores, the standard metric of AlphaFold. All five pLDDT scores were above 91 out of a maximum of 100. The top-ranked model with a score of 92.1 was selected for further analysis (Fig. 2B).

To check the validity of the model, we performed a BLASTp similarity search in the Protein Data Bank (PDB) using the SigA passenger domain as a query. The first hit we found was the structure of a homologous protein, with an identity of 46.4% and a similarity of 65%, representing the *E. coli* serine protease EspP (PDB-ID:3SZE and Swissprot-ID:O3259) (30). Our 3D model was superposed on the retrieved 3SZE structure and had a root mean square deviation (RMSD) of 3.6 angstrom (Fig. S2A) showing high similarity between the structures. As expected, the pLDDT scores along the SigA passenger domain were very good, except for local loop regions, which are generally more flexible and/or present less structured elements, making them more difficult to model (Fig. S2B-C). Moreover, the predicted distance errors between protein residues were very low, which supports the quality of the SigA model (Fig. S2D). We further analyzed the structural properties of our AlphaFold model of SigA. A globular N-terminal region that folds into both α -helices and β -strands is connected to an elongated triangular prism of parallel β -strands. Interestingly, the Leu497 - Arg560 region exits the prism and contributes to the folding of the globular region, while the Lys598 to Gly628 region folds to form an antiparallel β -sheet and a loop, both lying on the prism. The catalytic residues (Ser258, His126 and Asp154) are localized in the globular region of the passenger domain, as expected (Fig. S2E).

We further investigated how the secretion of *Shigella* SPATEs is regulated by microenvironmental factors.

It was reported that the secretion of SPATEs was thermoregulated in enteroaggregative *E. coli* (Pic (31)), *S. flexneri* 5a (SepA (15)), and *S. sonnei* (SigA (32)), although we did not observe significant temperature-dependent regulation of SPATE secretion in *S. sonnei*, *S. flexneri* 5a, and *S. flexneri* 2a (grown at 30°C, 37°C, or 42°C) (Fig. S3A). *Shigella* SPATEs were secreted by all *Shigella* strains tested regardless of temperature. In contrast, the oxygen-dependent regulation of SPATEs expression and secretion has not yet been studied, especially in poorly oxygenated environments such as plasma. We demonstrated that the secretion of SPATEs in *S. flexneri* 2a (SepA, Pic, SigA), *S. flexneri* 5a (SepA), and *S. sonnei* (SigA) was independent of oxygen availability, as observed by Coomassie staining (Fig. 2C) and confirmed by western blot analysis using specific α -SPATE antibodies (Fig. S3B). Consistently, at a transcriptional level, no-oxygen-dependent regulation of the expression of SPATE encoding genes was observed in the tested *Shigella* strains (Fig. 2D). In other words, we demonstrated that SPATEs are produced and secreted by *S. sonnei*, *S. flexneri* 5a and 2a in the absence of oxygen, a condition encountered by *Shigella* in hypoxic foci of infection (18) and in plasma (19), supporting their potential involvement during hemorrhage or bacteremia. To proceed, *S. flexneri* 5a and *S. sonnei* were used as models because they express and secrete only one member of the SPATE family (SepA and SigA, respectively).

SPATEs are essential for Shigella dissemination in the blood in vivo

To define the importance of SPATEs during the *S. flexneri* 5a and *S. sonnei* virulence cycles *in vivo*, *S. sonnei* $\Delta sigA$ and *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ mutant strains were constructed, together with complemented strains.

Upon intrarectal challenge of ascorbate-deficient guinea pigs (17), we demonstrated that *S. sonnei* $\Delta sigA$ and *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ mutants were attenuated upon prolonged infections (up to 48h) using complementary methods (Fig. 2E and S3C-E). First, we showed that the weight of animals infected by *S. sonnei* $\Delta sigA$ and *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ strains was significantly higher 48h p.i. compared to animals infected by the corresponding wild-type or complemented strains, with marked weight gain between 24h p.i. and 48h p.i. (Fig. S3C). Since *Shigella* infection severity is correlated to guinea pig weight loss, these results were consistent with the reduced virulence of *S. sonnei* $\Delta sigA$ and *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ mutant strains. To correlate these results with the bacterial load in the colon and in the bloodstream, CFU counts were assessed in lumen, mucosa and in blood (Fig. 2E).

CFU counting revealed that *S. sonnei* $\Delta sigA$ and *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ mutant strains had a reduced ability to colonize the colonic mucosa, and unable to survive in animal blood, in contrast to the wild-type and complemented strains (Fig. 2E). We confirmed the absence of RBCs (hemorrhage markers) in the colonic mucosa of guinea pigs infected by *S. sonnei* $\Delta sigA$ and *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ mutant strains (Fig. S3D), as observed with wild-type strains (Fig. 1A), suggesting that these mutant strains did not alter the colonic mucosa microvasculature. We confirmed that *S. sonnei* $\Delta sigA$ and *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ mutant strains were not detected in CD31+/CD34+ blood vessels (Fig. S3E), in contrary to wild-type strains (Fig. 1B).

These results strongly suggested that SPATEs contribute to the survival of *Shigella* strains to plasma exposure, which occurs in hemorrhagic tissues and in the bloodstream.

SPATEs promote the survival of *Shigella* to plasma exposure.

We demonstrated that *S. sonnei* $\Delta sigA$ and *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ mutant strains treated with plasma at all time points had a significant growth defect (Fig. 3A-B), and we confirmed in the absence of plasma that both mutant strains had no growth defect (Fig. S4A), confirming the importance of SPATEs in the ability of *Shigella* strains to survive in plasma. We showed by live microscopy the growth defect due to plasma of both *S. sonnei* $\Delta sigA$ and *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ (Fig. S4B-C). The growth defect of the *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ mutant strain in the presence of plasma, although significant, was weaker as compared to *S. sonnei* $\Delta sigA$ mutant strain, compared to corresponding wild-type strains (Fig. 3A-B), we further aimed at confirming the importance of SepA in the capacity of *S. flexneri* 5a to survive and grow in the presence of plasma. Since the significant growth defect of the *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ mutant was less pronounced than that of *S. sonnei* $\Delta sigA$ mutant, we sought to address the importance of SepA in the growth and survival of *S. flexneri* 5a in plasma. We demonstrated that the BS176 strain (Plasmid-cured *S. flexneri* 5a M90T) had a growth defect in the presence of plasma and had a rounded-cell phenotype (Fig. S4D). We showed that the overexpression of SepA in BS176 (BS176 pSepA strain) suppressed the growth defect in the presence of plasma, but not the overexpression of the catalytically inactive SepA_{S211A} (BS176 pSepA_{S211A} strain) (Fig. S4D). These complementary results confirmed the contribution of SepA to the survival of *S. flexneri* 5a in plasma.

Since it was previously reported that Pic targeted C3 (23), we hypothesized that the activation of the plasma complement system was responsible of the growth defect of *S. sonnei* $\Delta sigA$ and *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ mutant strains. Indeed, we demonstrated that the growth defect in plasma was reversed when plasma was de complemented (Fig. 3C-D) with the mutants growing at the same rate as wild-type strains (Fig. S4E-F). These results supported our hypothesis and we further aimed to identify the complement component, which may be targeted by SigA and SepA.

SigA and SepA cleave complement component 3 (C3)

To identify SPATE targets in plasma, we used an unbiased approach consisting of incubating albumin-free plasma with purified SigA or SepA (Fig. 3E). Removing albumin, the major protein in

plasma, was mandatory to visualize less abundant plasma proteins at the same molecular weight (67 kDa). In the presence of SigA or SepA, plasma proteins located in an identified band around 70 kDa disappeared (Fig. 3E). By mass spectrometry analysis, we identified complement component 3 (C3) as the most abundant protein composing both bands (1 and 2) (Fig. 3F). It must be noticed that fibrinogen alpha chain was also abundant in these bands (Fig. 3F). Since to our knowledge, fibrinogen had no direct antimicrobial activity, we focused on the cleavage of C3 by SPATEs. Commercially purified C3 was incubated with purified SigA and SepA and Coomassie staining revealed new bands confirming SPATEs target C3 (Fig. 3G-H). We further identified C3-degradation products by western blotting, and we showed that heat-inactivated SigA and SepA were no longer able to cleave C3 (Fig. 3I). (As controls,) we further demonstrated that SigA and SepA did not cleave complement C5 or various immunoglobulins such as IgG, IgM, IgA (Fig. S5A-B). To identify the SPATE cleavage site on C3, the sequences of C3 α -chain, β -chain and the cleaved α -chain formed in the presence of SigA, were analyzed by mass spectrometry. We could only identify one potential cleavage site of SigA, located in the complement C3 α -chain between residues 680 and 740 (Fig. S5C). Despite several attempts, we failed to proceed similarly with C3 incubated with SepA (data not shown).

Taken together, our results showed that SPATEs contribute to the impairment of the complement system by *Shigella*, allowing its survival to plasma. Since we demonstrated that plasma content was released within the infected colonic mucosa, we further aimed to confirm the presence of C3 and other plasma components such as albumin, the most abundant plasma protein, in this microenvironment.

***Shigella*-C3 interaction occurs within hemorrhagic infected tissues**

Since we demonstrated that hemorrhage was caused by *Shigella* infection with the detection of RBCs in the colonic mucosa (Fig. 1A), we further aimed to confirm this result and evaluate the distribution of plasma components (C3 and albumin) in relation with *Shigella* dissemination. In non-infected tissues, we could first immunodetect C3 and albumin strictly localized within blood vessels (Fig. 4A-B). We observed that C3 and albumin were more abundant in the colonic mucosa infected by *S. sonnei* and *S. flexneri* wild-type strains compared to the uninfected animals, and we demonstrated that *Shigella* foci co-localized with both C3 and albumin, confirming the interaction between *Shigella* and plasma components in hemorrhagic tissues (Fig. 4A-B). As control, we did not observe changes in C3 and albumin abundance and distribution with tissues infected by *S. sonnei* $\Delta sigA$ and *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ mutant strains compared to the non-infected tissues (Fig. S6A-B), confirming the absence of hemorrhage in this context, as previously reported (Fig. S3D-E).

Discussion

In this report, we demonstrated that all tested *Shigella* strains survive exposure to plasma (Fig. 1C) which not only occurred during bacteremia but also upon hemorrhage induced by *Shigella* in the colonic mucosa (Fig. 1A). We demonstrated that SPATEs contribute significantly to the ability of *Shigella* to survive plasma exposure by cleaving the central component of the complement system, the complement component 3 (C3) (Fig. 3E-I). Our results shed new light on the antimicrobial activity of the complement system, which is active outside of the blood circulation, within hemorrhagic tissues, like the colonic mucosa infected by *Shigella*.

The invasive attenuation of *S. sonnei* $\Delta sigA$ and *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ mutant strains (Fig. 2E, S3C-E and S6A-B) may be explained by their inability to resist the complement system within the colonic mucosa, hence impairing their dissemination within infected tissues. It must be noticed that additional virulence mechanisms involved in the complement system subversion may be expressed by *S. flexneri* 5a, because the susceptibility to plasma of the *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ mutant strain was less pronounced than the *S. sonnei* $\Delta sigA$ mutant strain (Fig. 3A-B).

Additionally, in this study, we characterized molecular aspects of the hemorrhage induction during shigellosis, thanks to the validation of a new animal model of shigellosis which allowed us to follow prolonged infection episodes (17). We also reported how *Shigella* reached specifically blood vessels in the colonic mucosa at late infection stage (Fig. 1B). Since we previously demonstrated that *Shigella* aerobic respiration was essential to the formation of hypoxic foci of infection, further investigations will be required to better appreciate the importance of endothelial damages caused by *Shigella*, and previously reported in shigellosis patients (13), in the maintenance of low-oxygen levels within infected tissues and its importance to the development of the disease.

Materials and Methods

Bacterial strains and plasmids

All strains and plasmids used in this study are listed in Table S1. *S. sonnei* wild-type strain was obtained from the Pasteur Institute collection (CIP 106347). *S. flexneri* 2a and *S. flexneri* 5a wild-type strains belong to the laboratory collection. BS176 is *S. flexneri* 5a cured from its pINV virulence plasmid (33). *E. coli* K12 (*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655) was used as a control. *S. sonnei* $\Delta sigA$ and *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ mutant strains were constructed with the lambda-red recombination method (34). In brief, *sigA* and *sepA* genes were replaced by a chloramphenicol resistance cassette, which was amplified from the PKD3 plasmid using primers listed in Table S2. Complementation of *S. sonnei* $\Delta sigA$ and *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ mutant strains was performed with the plasmid pSigA3 (pSigA, AmpR) (kindly provided by M. Meza-Segura (35)) and pZK15 (pSepA) (36), (kindly provided by Pr. Claude Parsot) respectively. The strain *E. coli* HB101 pPic1 (37) was used to overexpress and purify the protein Pic. *Shigella* strains were grown in TSB liquid medium and on TSB petri dishes supplemented with 0,1% Congo Red and *E. coli* K12 strain was grown in LB liquid medium and LB agar plates. Antibiotics were added when required at the following concentrations: Ampicillin 100µg/ml, Chloramphenicol 30 µg/ml, Tetracycline 10µg/ml.

SigA, SepA and Pic purification

SigA was purified from *S. sonnei* culture supernatant. Briefly, bacteria were grown overnight at 37°C and subcultured in a fresh medium for 5 h at 37°C. SepA and Pic were purified from BS176 pSepA and *E. coli* HB101 pPic strain, grown overnight at 37°C.

SigA purification. The bacterial culture was centrifuged for 15 min at 4.000 x *g* at 4°C and the supernatant was filtered through a 0.22µm filter and subsequently precipitated in ammonium sulfate (35% w/v) for 45 min at 4°C under gentle agitation. The precipitated supernatant was centrifuged for 30 min at 7.500 x *g*, and the pellet was resuspended in 25mM NaH₂PO₄, 25mM Na₂HPO₄, 50mM NaCl buffer (pH 7.5) and dialyzed overnight in the same buffer. The dialyzed sample was loaded onto a DEAE column (TSK-gel DEAE-5PW - Tosoh) and a NaH₂PO₄ 25mM/Na₂HPO₄ 25mM/NaCl 1M gradient (pH 7.5) was applied. Purified SigA was collected, quantified, and stored at 4°C (for up to one month).

SepA and Pic purification. Bacterial cultures were centrifuged for 15 min at 4000 x *g* at 4°C and the supernatant was filtered through 0.22µm filters and subsequently precipitated in ammonium sulfate (30% w/v) for 45 min at 4°C under gentle agitation. Precipitated samples were centrifuged for 30 min at 7500 x *g* at 4°C and pellets were resuspended in 1X Phosphate Buffer Saline (PBS). Samples were concentrated on a 100kDa cut-off Amicon filter (Merck) and loaded on a gel filtration column (Superdex 200 10/300 GL – GE Healthcare). Purified SepA and Pic were collected, quantified, and stored at -20°C (for up to one month).

Production of anti-SPATEs antibodies

Rabbit polyclonal antibodies specific of SigA, Pic and SepA were produced. Briefly, SigA, Pic, and SepA were purified by ammonium sulfate precipitation, concentrated, and further dialyzed. New Zealand rabbits were immunized by the Genecust company through series of injections. Antibodies were purified on by affinity chromatography. Antibodies were stored at -20°C in PBS supplemented with 0,02% NaN₃. Antibodies were further purified by affinity to the corresponding SPATE transferred on a nitrocellulose membrane from supernatants of *S. flexneri* 5a BS176 pSepA, *S. sonnei* Δ sigA pSigA and *E. coli* HB101 pPic, after a migration SDS-PAGE. Specific bands corresponding to SepA, SigA or Pic were cut, blocked with PBS supplemented with 0.1% Triton X-100 + 10% Fetal Bovine Serum and incubated overnight with anti-SepA serum, anti-SigA serum or anti-Pic serum respectively. After several washes with the blocking buffer, bound antibodies were collected using Glycine 0.2M pH2.8 supplemented with 0.2% Gelatin, then the pH was quickly neutralized with 25% v/v unbuffered Tris 1M. Purified antibodies were tested on whole supernatants to assess their purity.

Human plasma collection and treatment

Human blood was collected from the antecubital vein of anonymous voluntary donors at the Etablissement Français du Sang de Strasbourg (authorization n°ALC/PIL/DIR/AJR/FO/606). Blood bags of 500 mL were collected and rapidly transferred into an anoxic chamber (DG250, Don Whitley). The platelet-free plasma fraction was collected by centrifugation for 20 min at 3.800 rpm and was further stored at -20°C. Decomplemented plasma was obtained by heating plasma for 30 min at 56°C and was further stored at -20°C. Albumin-free plasma was obtained following the Minute™ Albumin Depletion Reagent for Plasma and Serum kit instructions (Invent Biotechnologies) and was stored at -20°C.

Bacterial growth assay

Bacteria were grown in M9 minimal medium (Merck) supplemented with 2 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂, and 0,4% glucose overnight at 37°C (180 rpm). Bacterial cultures were diluted to OD_{600nm} 0.05 in fresh rich M9 media and were grown for 2 hours at 37°C to reach OD_{600nm} 0,22. 1µl of bacterial culture and 5µl of PBS, plasma or decomplemented plasma were deposited onto a 1% M9-agar pad. Pads were then incubated for up to 18 hours at 37°C in humid conditions to allow bacterial growth. Images were taken at T=0, T=4h, and T=18h with an Axioskop 2 light microscope (Zeiss, Germany) equipped with an Optikam Pro6 digital Camera (Optika, Italy) and a X100 objective (Plan-NEOFLUAR 100X 1.3NA Ph3 oil). Bacterial growth quantification was assessed by quantifying the culture confluence (expressed as %), using the Fiji v2.1.0 software.

SigA structure prediction

To predict the structure of the passenger domain of *S. sonnei* SigA, the protein sequence Uniprot-ID:Q3YXF8 (NCBI protein sequence WP_052993189) from residue Met56 to Asn1008 was submitted to Colabfold v1.5.2 that implements AlphaFold2. Five models were requested with AMBER force field relaxation. The BLASTp similarity search with SigA passenger domain as a query was carried out with default parameters (Expect threshold 0.05, word size 5, BLOSUM62 scoring matrix, gap creation penalty 11, gap extension penalty 1) in the PDB. Structure manipulations were carried out in PyMOL 1.8.4. The align function which is based on primary

sequence comparison was used to superimpose structures. Calculations of RMSD were run in Visual molecular dynamics (VMD) 1.9.3. The predicted structure of SigA was deposited with ModelArchive and is publicly available (<https://modelarchive.org/doi/10.5452/ma-s7yqq>).

SPATEs secretion regulation

To study the regulation of SPATE secretion, bacterial cultures of *S. sonnei*, *S. flexneri* 2a and *S. flexneri* 5a were grown O/N at 37°C (180 rpm). The following day, cultures were diluted in fresh culture medium at an initial OD_{600nm} of 0.05. To study the O₂-dependent regulation of SPATE secretion, cultures were incubated at 37°C either under atmospheric conditions with agitation, or in an anoxic chamber (Don Whitley ; DG250). To study the temperature-dependent regulation of SPATE secretion, cultures were incubated at 30°C, 37°C, or 42°C for 6 hours with agitation (180 rpm) under atmospheric conditions.

In all tested conditions, supernatants were collected by centrifugation for 30 min at 4.000 rpm, and were subsequently filtered (0,22µm) and precipitated in 35% ammonium sulfate (w/v). Precipitated proteins were pelleted by centrifugation (30 min at 7.500 x g at 4°C) and further resuspended in 1X PBS. Protein concentration was adjusted by concentrating of the samples on 100kDa filters (Amicon, Merck). Samples were loaded on 10% SDS-PAGE gel and SPATEs were visualized by Coomassie Blue staining (Instant Blue, Abcam) or western blot using specific antibodies. In more details, proteins were transferred on PVDF membranes and rabbit polyclonal antibodies were used at a 1:500 dilution (anti-Pic and anti-SepA) or a 1:250 dilution (anti-SigA) in 1X TBS supplemented with 0,5% of Tween 20 (Merck) and 3% BSA (Euromedex). A horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Abcam) was used at a 1:10000 dilution and combined to a Super Signal ECL kit (Thermoscientific). Membranes were imaged with a ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad).

Quantitative Real-time PCR analysis

S. flexneri 2a, *S. flexneri* 5a, and *S. sonnei* were cultured for 5 hours at 37°C (180 rpm) and bacteria were pelleted (15 min centrifugation at 4000 rpm) to proceed with RNA extraction. Total RNAs were extracted by phenol/chloroform and precipitated. After DNase treatment, RNAs were reverse transcribed using *iScript™ Reverse Transcription Supermix* (Bio-Rad) and cDNAs were amplified by quantitative RT-PCR (qRT-PCR). Reactions were carried out on a CFX96 Real-Time PCR detection system (Bio-Rad) using the Maxima SYBR Green kit (Thermo Scientific). Oligonucleotides used for qRT-PCR are listed in Supplementary Table S2. qRT-PCR reactions were performed and designed according to the MIQE guidelines (38) The specificity of the oligonucleotides was validated, and the amplification efficiencies of the primer sets were between 90 and 110% with r² values greater than 0.98. Relative mRNA expression levels were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method. Results were expressed as mean +/- standard error of an average of three measurements.

SPATE proteolytic assays

To identify targets, purified SPATEs were incubated with various substrates in 1X PBS at 37°C. Albumin-free plasma and commercially available purified C3, C5, IgG, IgA or IgM (Merck) were incubated for 18 hours at 37°C in the absence or presence of purified SepA or SigA, at the indicated concentrations. Degradation products were separated on 10% SDS-PAGE gels and stained with Instant Blue solution or analyzed by western blot. When indicated, heat-inactivated (30min, 95°C) SigA and SepA were used as controls.

For western blot, O/N degradation products were loaded on a 10% SDS-PAGE gel and then transferred to a PVDF membrane. After 1 hour of blocking, the membrane was incubated O/N at 4°C with gentle agitation with 1:2000 goat anti-human complement C3 antibody (Thermo Scientific) diluted in 1X TBS/0,5% Tween/3% BSA. The next day, the membrane was washed three times in 1X TBS/0,5% Tween and incubated for 1 hour with 1:10 000 horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat IgG (Abcam). After three washes, the membrane was revealed using Super Signal ECL kit.

Mass-spectrometry analysis by nanoLC-MS/MS: in-gel samples, database search and protein validation

For LC-MS/MS analyses of the in-gel samples, samples were loaded on a 4-15% SDS-PAGE precast gel (Bio-Rad) and stain with Coomassie. Bands were excised from the SDS-PAGE gel, were destained several times in 50 mM ammonium bicarbonate containing 50% (v/v) acetonitrile, further dehydrated with 100% acetonitrile and then reduced with 10mM DTT for 1 hour at 56°C. Proteins were then alkylated with 55mM iodoacetamide for 1 hour in the dark at room temperature. Gel pieces were washed again with the destaining solution described above. 80 ng of modified sequencing-grade trypsin (10ng/μL; Promega, Fitchburg, MA, USA) were added to each dehydrated gel sample for overnight digestion at 37°C. Resulting peptides were extracted twice from the gel pieces with a first solution of 60% acetonitrile and 5% formic acid, followed by a second extraction in 100% acetonitrile. Gel supernatants were finally vacuum-dried in a SpeedVac concentrator. Digested peptides were resuspended in 20μL of 0.1% formic acid (solvent A) and injected on an Easy-nanoLC-1000 system coupled to a Q-Exactive Plus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Germany). Each sample was loaded on a C-18 precolumn (75 μm ID × 20 mm nanoViper, 3μm Acclaim PepMap; Thermo-Fisher Scientific) and separated on an analytical C18 analytical column (75 μm ID × 25 cm nanoViper, 3μm Acclaim PepMap) with a 60 minutes gradient of solvent B (0.1% of formic acid in acetonitrile).

MS data were searched with Mascot algorithm (version 2.8, Matrix Science) against either the UniprotKB database with *Shigella sonnei* taxonomy (22,219 sequences, version 2021_02), and the swissprot database with human taxonomy (20,396 sequences, version 2021_01) or the swissprot with all taxonomies (568,744 sequences, version 2022_05). The resulting Mascot files were imported into Proline v1.0 package (39) to align the identified proteins. Proteins were then validated on Mascot rank equal to 1, a Mascot score superior to 25, and 1% FDR on both peptide spectrum matches (PSM) and protein sets (based on Mascot score). For figure S5C, the number of observations of each amino acid from the sequences was counted in all the spectra validated with 1% FDR.

The ascorbate-deficient guinea pig model of shigellosis

The ascorbate-deficient guinea pig model shigellosis was previously described by Skerniskyte et al. (17) and was used here to study late infection stages (up to 48h) using the following strains: *S. sonnei* wild-type pGFP, *S. sonnei* Δ*sigA* pGFP, *S. flexneri* 5a wild-type pGFP, *S. flexneri* 5a Δ*sepA* pGFP, *S. sonnei* Δ*sigA* pSigA3, and *S. flexneri* 5a Δ*sepA* pSepA strains. Before the challenge, *sigA* and *sepA* expression was induced with 500μM IPTG from OD_{600nm} 0.3 to 0.6 in *S. sonnei* Δ*sigA* pSigA3 and *S. flexneri* 5a Δ*sepA* pSepA respectively. Briefly, 5-week ascorbate-deficient guinea pigs were intrarectally challenged with 10¹¹ CFU in the exponential phase (OD_{600nm} = 0.6). Upon infection, animals were weighted on a daily basis and 48 hours post-infection, animals were sacrificed, blood samples were collected by intracardiac puncture and colons were collected and flushed with 500μL PBS. Luminal CFU counting was performed by plating series of dilutions. Mucosal CFU counting was achieved by plating series of dilutions of homogenized colonic mucosa (0.5 cm tissue sections, weighted and processed in 500μL 1X PBS with Bead Mill Homogenizer,

VWR). Blood CFU counting was performed by plating 50 μ L of blood collected in the presence of an anticoagulant (citrate). For immunofluorescence imaging, 1 cm sections of colons were fixed in PFA, washed with a sucrose gradient (from 15% to 30% sucrose), and frozen in OCT blocks. Then 10 μ m thickness sections of colons were cut using a CM-3050 cryostat (Leica Biosystems).

Tissue labeling and imaging

For histological studies, sectioned tissues were stained with hematoxylin-eosin standard protocol and imaged with an Axioskop 2 transmission light microscope (Zeiss) using x10 or x20 objectives. For immunofluorescence, tissues were washed 3 times in PBS/0,1% Tritton, PBS, water, and stained O/N at 4°C in humid conditions with primary antibodies. Following antibodies were used as primary antibodies: 1:100 mouse anti-human CD31 (BD Pharmingen), 1:100 a mouse anti-human CD34 (Biolegend), 1:2000 goat anti-human complement C3 antibody (Thermo Fischer Scientific), 1:1000 goat anti-Albumin antibody (Sigma) and 1:1000 goat anti-Fibrinogen antibody (Thermo Fischer Scientific). The next day, slides were washed three times, and incubated for 1 hour at room temperature with 1:1000 of donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 568 (Invitrogen) and DAPI (Life Technologies). Slides were washed again, mounted with ProLongGold® (Invitrogen) and imaged using a laser-scanning TCS SP8 confocal microscope (Leica).

Acknowledgments

We thank Dr. Annick Dejaegere (IGBMC-Ilkirch, France) for supporting the structural analysis of SPATEs. We thank Dr. Mario Meza-Segura for sharing the pSigA plasmid and Dr. Fernando Luiz Perez for sharing the pPic plasmid

References

1. K. L. Kotloff, M. S. Riddle, J. A. Platts-Mills, P. Pavlinac, A. K. M. Zaidi, Shigellosis. *Lancet* **391**, 801–812 (2018).
2. S. K. Niyogi, Shigellosis. *J. Microbiol. (Seoul, Korea)* **43**, 133–43 (2005).
3. M. J. Struelens, *et al.*, Shigella Septicemia: Prevalence, Presentation, Risk Factors, and Outcome. *J. Infect. Dis.* **152**, 784–790 (1985).
4. C. Nayyar, P. Thakur, V. Tak, A. Singh, Shigella sonnei Sepsis in an Infant: A Case Report. *J. Clin. Diagn. Res.* **11**, DD01–DD02 (2017).
5. M. Delgado, *et al.*, Bacteriemia por Shigella flexneri en dos lactantes. *Rev. Chil. infectologa* **35**, 317–320 (2018).
6. R. M. Kligler, P. D. Hoeprich, Shigellemia. *West. J. Med.* **141**, 375–8 (1984).
7. S. M. Qadri, S. H. Khalil, Polymicrobial septicemia due to Shigella flexneri and pseudomonas aeruginosa: first report. *J. Natl. Méd. Assoc.* **79**, 1289–92 (1987).
8. C.-Y. Liu, Y.-T. Huang, C.-H. Liao, S.-C. Chang, P.-R. Hsueh, Rapidly Fatal Bacteremia Caused by Shigella sonnei without Preceding Gastrointestinal Symptoms in an Adult Patient with Lung Cancer. *Clin. Infect. Dis.* **48**, 1635–1636 (2009).

9. M. Tobin-D'Angelo, *et al.*, Shigella Bacteremia, Georgia, USA, 2002–2012 - Volume 26, Number 1—January 2020 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerg. Infect. Dis.* **26**, 122–124 (2020).
10. W. A. Khan, J. K. Griffiths, M. L. Bennish, Gastrointestinal and Extra-Intestinal Manifestations of Childhood Shigellosis in a Region Where All Four Species of Shigella Are Endemic. *PLoS ONE* **8**, e64097 (2013).
11. M. J. Struelens, *et al.*, Shigella Septicemia: Prevalence, Presentation, Risk Factors, and Outcome. *J. Infect. Dis.* **152**, 784–790 (1985).
12. J. M. van den Broek, *et al.*, Risk factors for mortality due to shigellosis: a case-control study among severely-malnourished children in Bangladesh. *J. Heal., Popul., Nutr.* **23**, 259–65 (2005).
13. R. Koshi, G. Chandy, M. Mathan, V. I. Mathan, Vascular changes in duodenal mucosa in shigellosis and cholera. *Clin. Anat.* **16**, 317–327 (2003).
14. F. Navarro-Garcia, Serine proteases autotransporter of Enterobacteriaceae: Structures, subdomains, motifs, functions, and targets. *Mol. Microbiol.* **120**, 178–193 (2023).
15. Z. Benjelloun-Touimi, P. J. Sansonetti, C. Parsot, SepA, the major extracellular protein of Shigella flexneri: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Mol. Microbiol.* **17**, 123–135 (1995).
16. D.-H. Shim, *et al.*, New Animal Model of Shigellosis in the Guinea Pig: Its Usefulness for Protective Efficacy Studies. *J Immunol* **178**, 2476–2482 (2007).
17. J. Skerniskyte, *et al.*, Ascorbate deficiency increases progression of shigellosis in guinea pigs and mice infection models. *Gut Microbes* **15**, 2271597 (2023).
18. J.-Y. Tinevez, *et al.*, Shigella-mediated oxygen depletion is essential for intestinal mucosa colonization. *Nat. Microbiol.* **4**, 2001–2009 (2019).
19. L. Injarabian, *et al.*, Ascorbate maintains a low plasma oxygen level. *Sci. Rep.* **10**, 10659 (2020).
20. B. Marteyn, *et al.*, Modulation of Shigella virulence in response to available oxygen in vivo. *Nature* **465**, 355–358 (2010).
21. F. Ruiz-Perez, *et al.*, Serine protease autotransporters from Shigella flexneri and pathogenic Escherichia coli target a broad range of leukocyte glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 12881–12886 (2011).
22. F. Ruiz-Perez, *et al.*, Serine protease autotransporters from Shigella flexneri and pathogenic Escherichia coli target a broad range of leukocyte glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 12881–12886 (2011).
23. A. G. Abreu, *et al.*, The Serine Protease Pic From Enteroaggregative Escherichia coli Mediates Immune Evasion by the Direct Cleavage of Complement Proteins. *J. Infect. Dis.* **212**, 106–115 (2015).
24. C. B. Xie, D. Jane-Wit, J. S. Pober, Complement Membrane Attack Complex New Roles, Mechanisms of Action, and Therapeutic Targets. *Am. J. Pathol.* **190**, 1138–1150 (2020).

25. A. C. André, *et al.*, The ascorbate-deficient guinea pig model of shigellosis allows the study of the entire *Shigella* life cycle. *bioRxiv*, 2020.08.28.270074 (2020).
26. A. Maldonado-Contreras, *et al.*, *Shigella* depends on SepA to destabilize the intestinal epithelial integrity via cofilin activation. *Gut Microbes* **8**, 544–560 (2017).
27. J. Jumper, *et al.*, Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589 (2021).
28. M. Varadi, *et al.*, AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* **50**, D439–D444 (2021).
29. M. Mirdita, *et al.*, ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat. Methods* **19**, 679–682 (2022).
30. S. Khan, H. S. Mian, L. E. Sandercock, N. Y. Chirgadze, E. F. Pai, Crystal Structure of the Passenger Domain of the *Escherichia coli* Autotransporter EspP. *J. Mol. Biol.* **413**, 985–1000 (2011).
31. I. R. Henderson, J. Czeczulin, C. Eslava, F. Noriega, J. P. Nataro, Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **67**, 5587–96 (1999).
32. K. Al-Hasani, *et al.*, The sigA Gene Which Is Borne on the she Pathogenicity Island of *Shigella flexneri* 2a Encodes an Exported Cytopathic Protease Involved in Intestinal Fluid Accumulation. *Infect. Immun.* **68**, 2457–2463 (2000).
33. P. J. Sansonetti, J. Mounier, Metabolic events mediating early killing of host cells infected by *Shigella flexneri*. *Microb. Pathog.* **3**, 53–61 (1987).
34. K. A. Datsenko, B. L. Wanner, One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 6640–6645 (2000).
35. M. Meza-Segura, *et al.*, SepA Enhances *Shigella* Invasion of Epithelial Cells by Degrading Alpha-1 Antitrypsin and Producing a Neutrophil Chemoattractant. *Mbio* **12**, e02833-21 (2021).
36. Z. Benjelloun-Touimi, P. J. Sansonetti, C. Parsot, SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Mol. Microbiol.* **17**, 123–135 (1995).
37. I. R. Henderson, J. Czeczulin, C. Eslava, F. Noriega, J. P. Nataro, Characterization of Pic, a Secreted Protease of *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **67**, 5587–5596 (1999).
38. S. A. Bustin, *et al.*, The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–622 (2009).
39. D. Bouyssié, *et al.*, Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics. *Bioinformatics* **36**, 3148–3155 (2020).

Figures

Figure 1. *Shigella* induces local hemorrhage, reaches blood vessels *in vivo* and survives to plasma exposure *in vitro*

(A) Guinea pig colonic mucosa infected for 48h with *S. sonnei* et *S. flexneri* 5a wild-type strains. Black dotted lines delineate abscesses. Bars, 100 μ m. Hemorrhage is associated with infiltration of Red Blood Cells (RBCs) within infected tissues, which were counted (Nb RBCs/mm²) in each condition. Results are expressed as mean \pm S.D (n=3). 'n.d.' means not-detected, *** indicates t-test $p < .001$. (B) CD31+/CD34+ colonic blood vessels were immunodetected in each condition (red/magenta), together with *S. sonnei* et *S. flexneri* 5a (green). DNA was stained with Dapi (blue). White boxes indicate individual blood vessels. Capillary lumens are figured with white dashed circles. Bars, 20 μ m (C-D) Growth of *E. coli* K12, *S. sonnei*, *S. flexneri* 5a and 2a strains on M9 agar pads in the presence of fresh human plasma at 37°C for 4h and 18h (C). Quantification of bacterial growth (D) by calculating confluence (%) of cultures. Results are expressed as mean \pm S.D (n=3). ** indicates t-test $p < .01$, *** indicates t-test $p < .001$.

Figure 2. SPATEs structure, secretion regulation and importance during *Shigella* infection

(A) SPATEs (SigA, SepA, Pic) secreted by *S. sonnei*, *S. flexneri* 5a and *S. flexneri* 2a wild-type strains were identified by mass spectrometry. (B) The 3D structure of *S. sonnei* SigA was generated with AlphaFold 2 (ModelArchive 10.5452/ma-s7yqq) and compared to the available structures of SepA (Uniprot: Q8VSL2/PDB: 5J44) and Pic (Uniprot: Q54151) (25-27). A rainbow color gradient was used from dark blue (N-terminus) to dark red (C-terminus). Black arrows show position of catalytic triad. (C) SPATE-containing culture supernatants from *S. sonnei*, *S. flexneri* 5a and *S. flexneri* 2a grown in -O₂ and +O₂ conditions. Samples were separated on a 10% SDS-PAGE gel and stained with Coomassie. Representative result of 3 independent experiments. (D) The expression of SPATE-encoding genes was quantified by qRT-PCR in *S. sonnei*, *S. flexneri* 5a and *S. flexneri* 2a grown in -O₂ and +O₂. *rrsA* mRNA levels were used as a control. Relative gene expression levels are expressed as mean \pm S.D (n=3). 'ns' indicates t-test $p > .05$. (E) The presence of indicated *Shigella* strains (wild-type, SPATE mutants and complemented strains) in the colonic lumen and mucosa and in the blood circulation of guinea pigs was assessed 48h p.i.. Results are expressed as mean \pm S.D (n=3). 'ns' indicates t-test $p > .05$, * indicates t-test $p < .05$, *** indicates t-test $p < .001$.

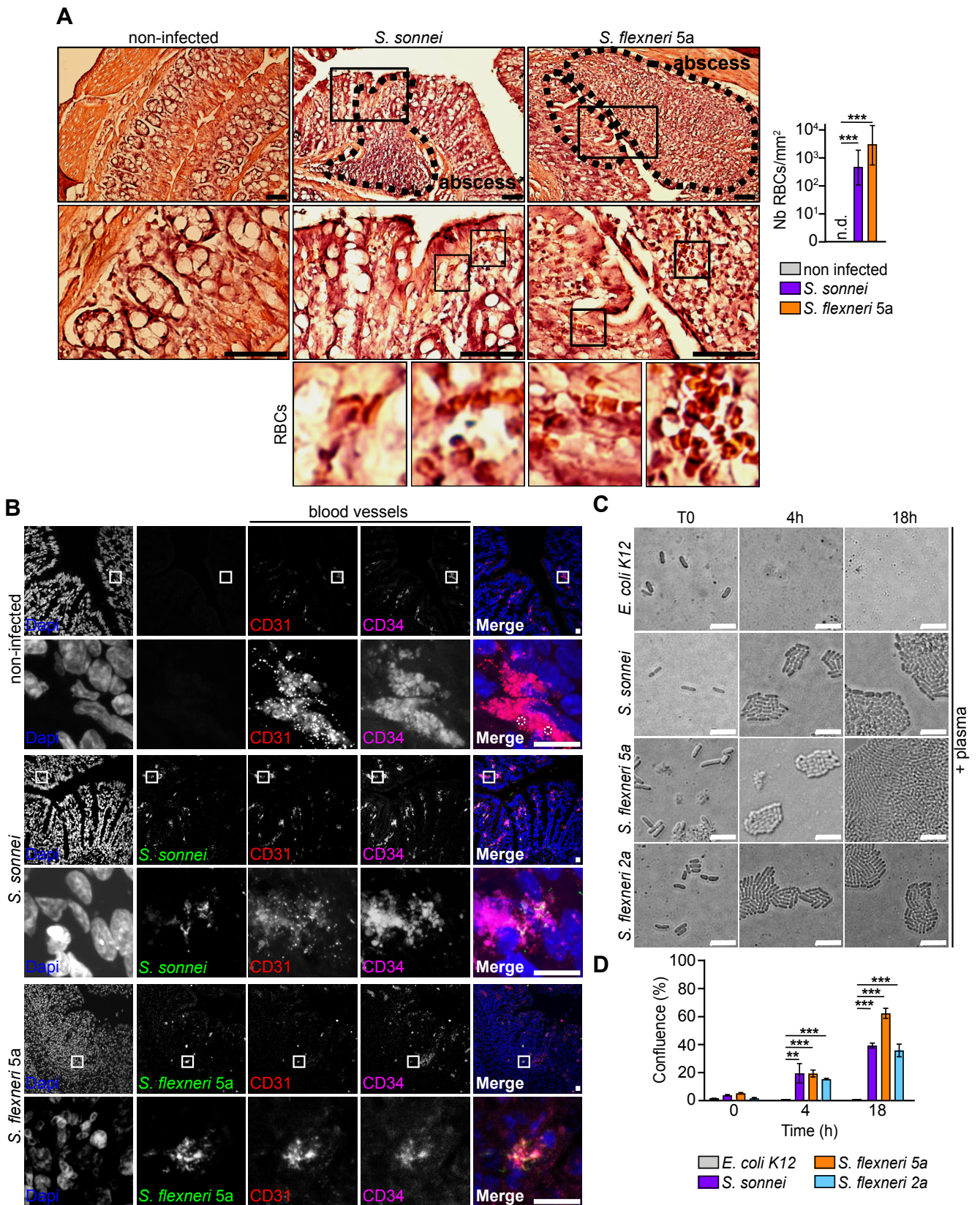
Figure 3. SPATEs are essential for *Shigella* survival to plasma exposure, by cleaving Complement C3.

(A-B) *S. sonnei* wild-type and Δ *sigA* strains (A) and *S. flexneri* 5a wild-type and Δ *sepA* strains (B) were incubated up to 18h in presence of fresh human plasma on M9 agar pads and the bacterial confluence was quantified. Results are expressed as mean \pm S.D (n=3). 'ns' indicates t-test $p > .05$, * indicates t-test $p < .05$, ** indicates t-test $p < .01$, *** indicates t-test $p < .001$. (C-D) *S. sonnei* Δ *sigA* (C) and *S. flexneri* 5a Δ *sepA* (D) strains were incubated in the presence of fresh human plasma or de complemented plasma (dc. plasma) and data were analyzed as in (A-B). (E) Human albumin-free plasma (AF plasma) was incubated O/N at 37 °C with purified SigA or SepA and was analyzed on 10% SDS-PAGE gel, stained with Coomassie. (F) Mass spectrometry analysis of Band 1 and 2, as indicated (from gel in (E)). (G-H) Purified human complement component 3 (C3, α -chain/ β -chain) was incubated with purified SigA and SepA for 18 hours at 37°C, samples were processed as in (E). (I) Impact of SigA and SepA heat-inactivation (HI) on C3 cleavage. Samples

were analyzed by western blot using human anti-C3 antibody (top) and SigA and SepA were stained with Coomassie (bottom).

Figure 4. *Shigella* are exposed to complement C3 *in vivo* during hemorrhage.

(A) Guinea pig colonic mucosa infected by *S. sonnei* and *S. flexneri* 5a wild-type strains (green) for 48h. Infected and non-infected tissues were stained with an α -human complement C3 antibody (red) and DNA was stained with Dapi. Bars, 50 μ m. **(B)** Tissue hemorrhage was further emphasized in using an α -human albumin antibody (red) upon infection by *Shigella* (green). DNA was stained with Dapi. Bars, 50 μ m.



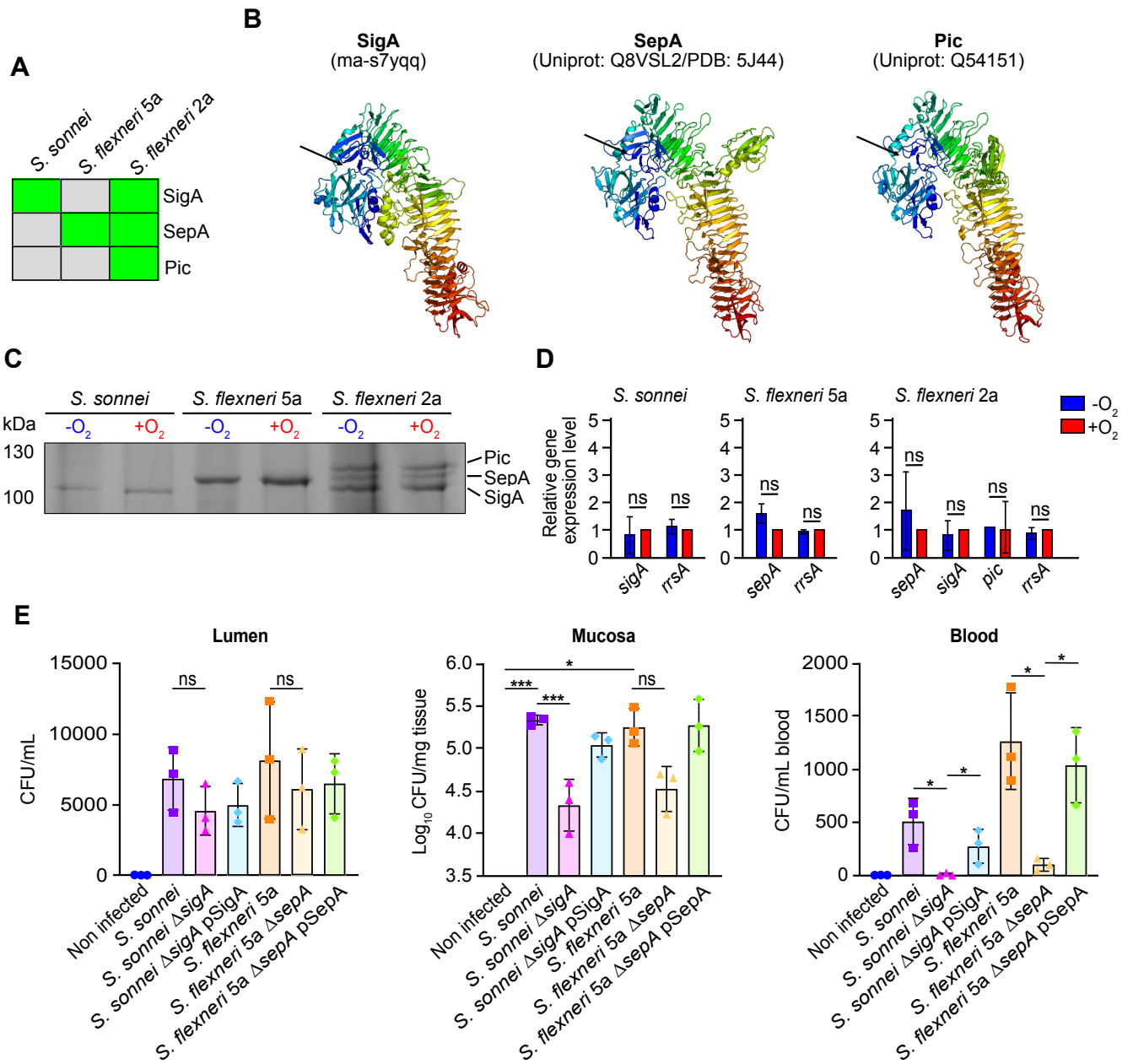


Figure 2. SPATEs structure, secretion regulation and importance during *Shigella* infection

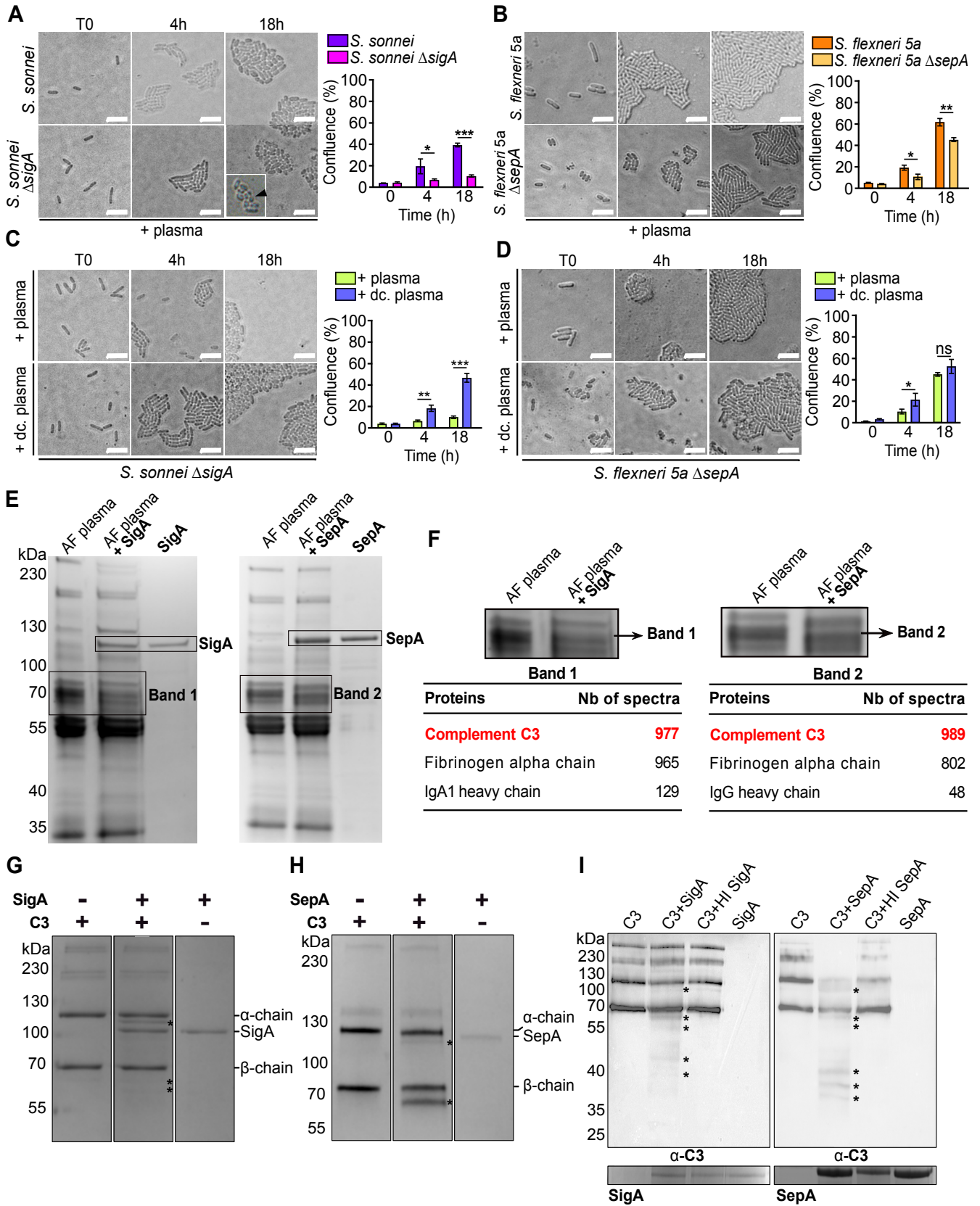


Figure 3. SPATEs are essential for *Shigella* survival to plasma exposure, by cleaving Complement C3.

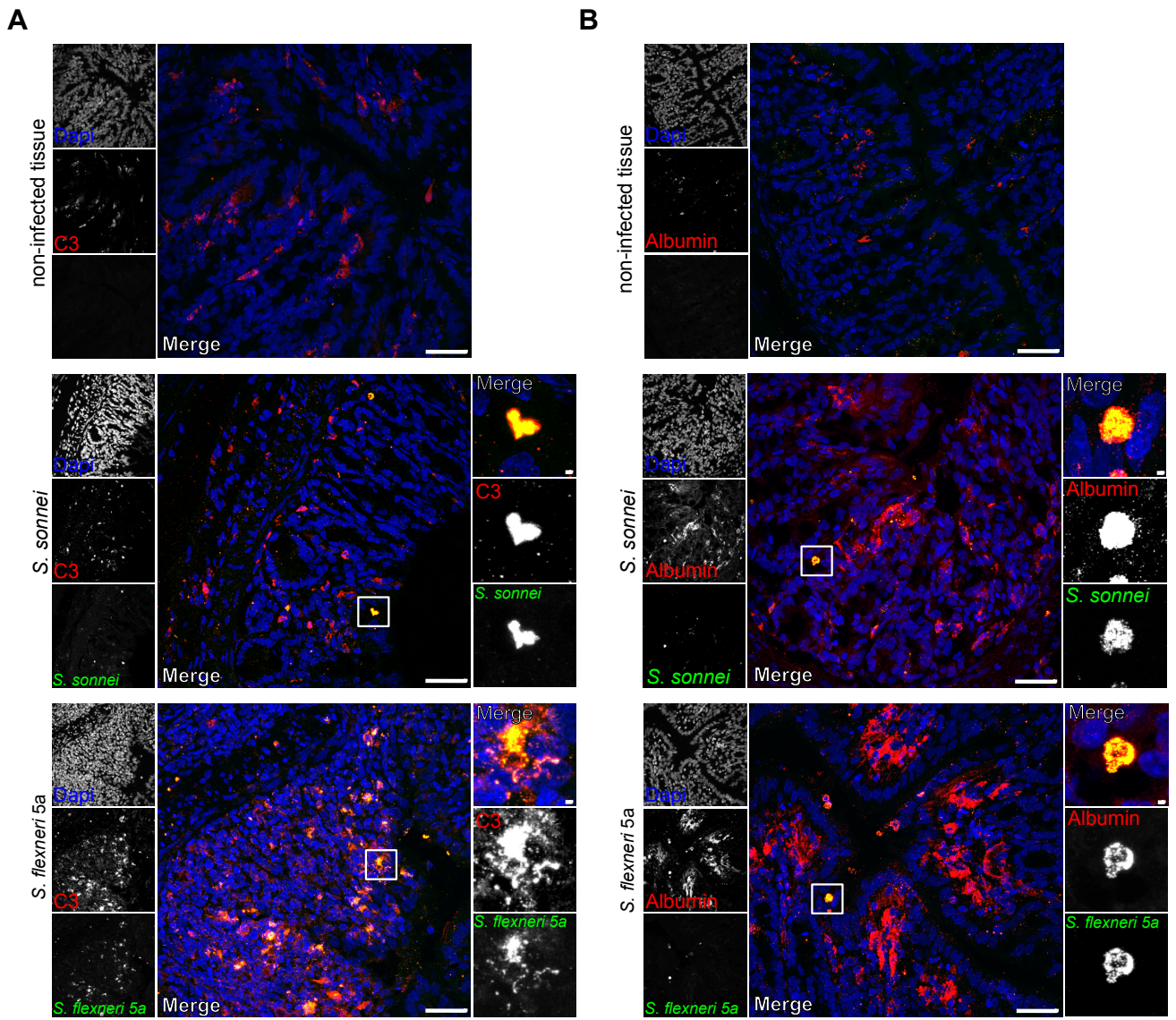


Figure 4. *Shigella* are exposed to complement C3 *in vivo* during hemorrhage.

Supporting Information for

SPATEs promote the survival of *Shigella* to the plasma complement system upon hemorrhage and bacteremia

Lorine Debande^a, Ahmad Sabbah^a, Laurianne Kuhn^b, Patryk Ngondo^a, Antonin André^a, Béatrice Roche^a, Matthieu Laborde^a, Victoria Cantalapiedra-Mateo^a, Tamou Thahouly^a, Ana Milinski^c, Laurent Bianchetti^c, Christine Allmang-Cura^a, Magali Frugier^a, Benoit S Marteyn^{a,d,e,1}

Corresponding author : Dr. Benoit S Marteyn

Emails: marteyn@unistra.fr or marteyn@pasteur.fr

This PDF file includes:

Figures S1 to S6
Tables S1 to S2
SI References

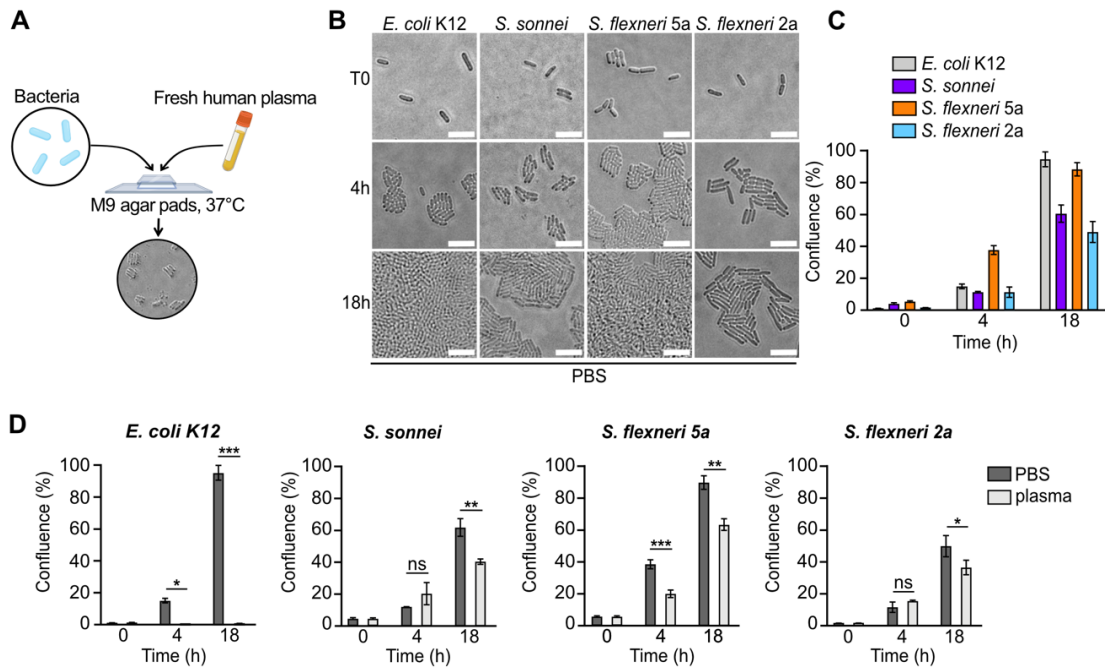


Figure S1. Comparative analysis of bacterial growth in PBS and plasma.

(A) Experimental procedure used to study bacterial growth and survival on M9 agar pads **(B)** *E. coli* K12 and indicated *Shigella* strains were grown on M9 agar pads supplemented with PBS for up to 18h at 37°C. Bars, 2µm. **(C)** Quantification of bacterial growth **(B)** by calculating confluence (%) of cultures. Results are expressed as mean ± S.D (n=3). **(D)** Comparative analysis of bacterial growth on M9 agar pads upon supplementation of PBS or fresh human plasma. Results are expressed as mean ± S.D (n=3). 'ns' indicates t-test $p > .05$, * indicates t-test $p < .05$, ** indicates t-test $p < .01$, *** indicates t-test $p < .001$.

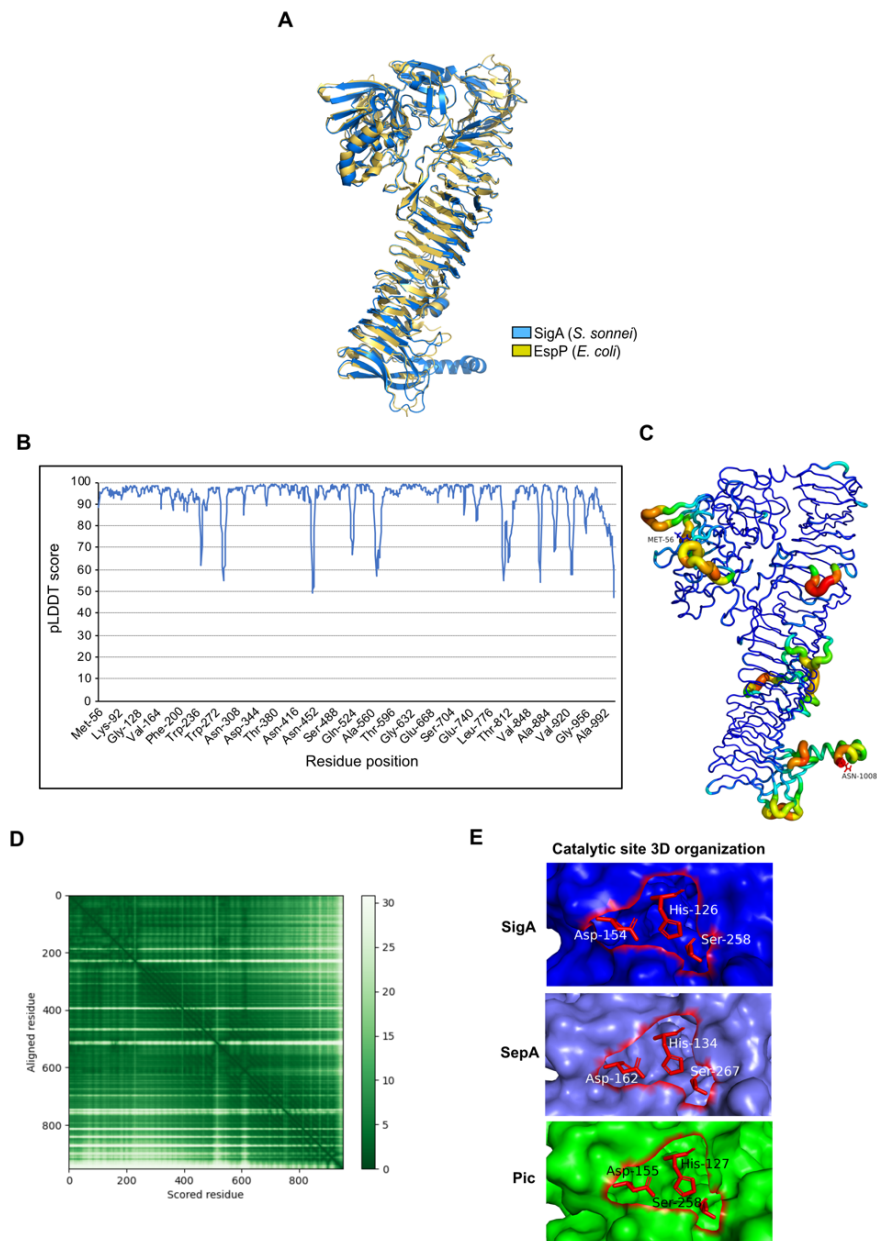


Figure S2. SigA 3D model prediction and catalytic sites

(A) SigA and EspP passenger domain 3D structure superposition. SigA and EspP (PDB: 3SZE) are colored in blue and gold, respectively. (B) SigA AlphaFold 2 pLDDT scores along the sequence. The larger the score the higher the prediction quality. Above 90: very high quality, between 90 and 70: high quality, between 70 and 50: low quality, below 50: very low quality. (C) pLDDT scores mapped onto the SigA structure model. A color gradient and thickness of cartoon shapes are associated with structure prediction reliability. Dark blue and thin cartoon regions show high confidence regions while dark red and thick cartoons display less reliable model. (D) SigA 3D model predicted aligned error (PAE). The graph shows expected inter-residue distance error, measured in angstroms. On the X-axis, the protein sequence is represented from the N-terminus to the C-terminus from left to right while on the Y-axis it is represented from top to bottom. (E) 3D representation of SigA, SepA, Pic catalytic sites. Catalytic residues were drawn as red sticks.

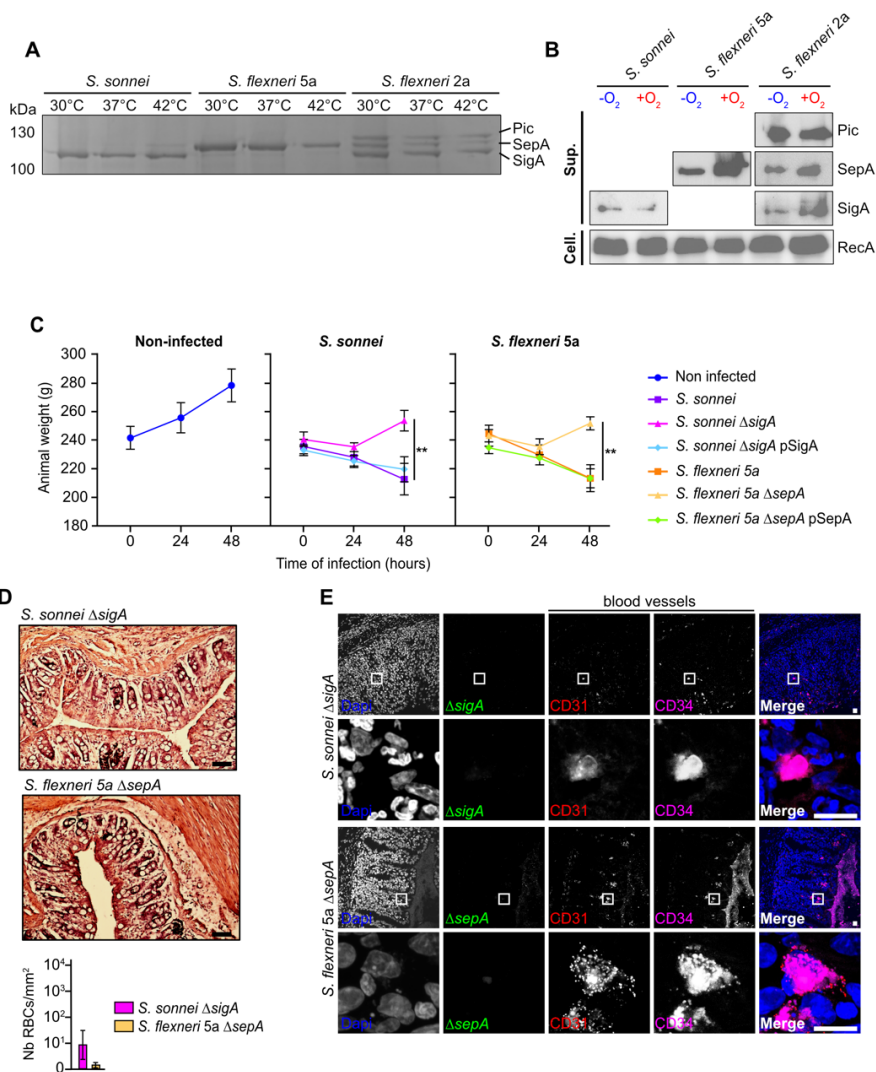


Figure S3. Regulation of SPATEs secretion and importance during *Shigella* infection
(A) SPATE-containing culture supernatants from *S. sonnei*, *S. flexneri* 5a and *S. flexneri* 2a grown for 5h at 30°C, 37°C and 42°C were separated on 10% SDS-PAGE gel and stained with Coomassie. **(B)** Confirmatory results to Fig. 2C. Western Blot analysis of SPATE-containing culture supernatants (Sup.) from *S. sonnei*, *S. flexneri* 5a and *S. flexneri* 2a grown in -O₂ and +O₂ conditions. RecA was used as a control (cell.). Representative result of 3 independent experiments. **(C)** Complementary experiment to Fig. 2E. Weight of guinea pigs infected with indicated *Shigella* strains (wild-type, SPATE mutants and complemented strains) for 48 hours. Results are expressed as mean ± S.D (n=3). ** indicates t-test $p < .01$. **(D)** Complementary result to Fig. 1A. Guinea pig colonic mucosa infected for 48h with *S. sonnei* Δ*sigA* and *S. flexneri* 5a Δ*sepA* strains. Bars, 100 μm. Red Blood Cells (RBCs) which were counted (Nb RBCs/mm²) in each condition. Results are expressed as mean ± S.D (n=3). **(E)** CD31+/CD34+ colonic blood vessels were immunodetected in each condition (red/magenta), together with *S. sonnei* Δ*sigA* and *S. flexneri* 5a Δ*sepA* mutant strains (green). DNA was stained with Dapi (blue). White boxes indicate individual blood vessels. Bars, 20 μm.

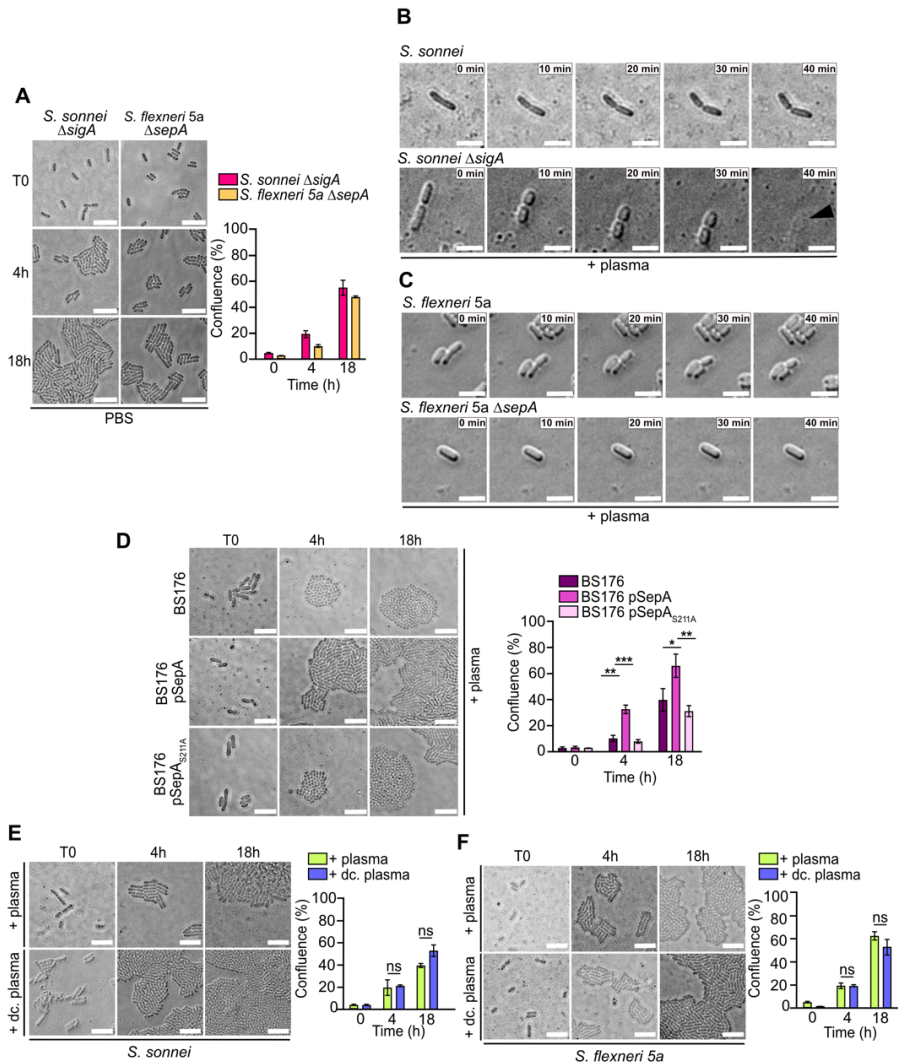


Figure S4. Importance of SPATE on *Shigella* survival to plasma exposure

(A) *S. sonnei* $\Delta sigA$ and *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ mutant strains were grown up to 18 h in the presence of PBS on M9 agar pads at 37°C. Quantification of bacterial growth (A) by calculating confluence (%) of cultures. Results are expressed as mean \pm S.D (n=3). (B-C) Time-course analysis of the growth and survival of (B) *S. sonnei* wild-type and $\Delta sigA$ mutant strains, and (C) *S. flexneri* 5a wild-type and $\Delta sepA$ mutant strains on M9 agar pads in the presence of plasma at 37°C for 40 min. Black arrow indicates bacterial lysis. Pictures were acquired every 10 min. Bars, 2 μ m. (D) Growth of BS176, BS176 pSepA and BS176 pSepA_{S211A} strains on M9 agar pads in the presence of plasma at 37°C for up to 18h. Quantification of bacterial growth (D) by calculating confluence (%) of cultures. Results are expressed as mean \pm S.D (n=3). * indicates t-test $p < .05$, ** indicates t-test $p < .01$, *** indicates t-test $p < .001$. (E-F) Complementary result to Fig. 3C-D. (E) *S. sonnei* and (F) *S. flexneri* 5a wild-type strains were incubated in the presence of fresh human plasma or decomplexed plasma (dc. plasma) at 37°C for up to 18h. The confluence of cultures was quantified. Results are expressed as mean \pm S.D (n=3). 'ns' indicates t-test $p > .05$.

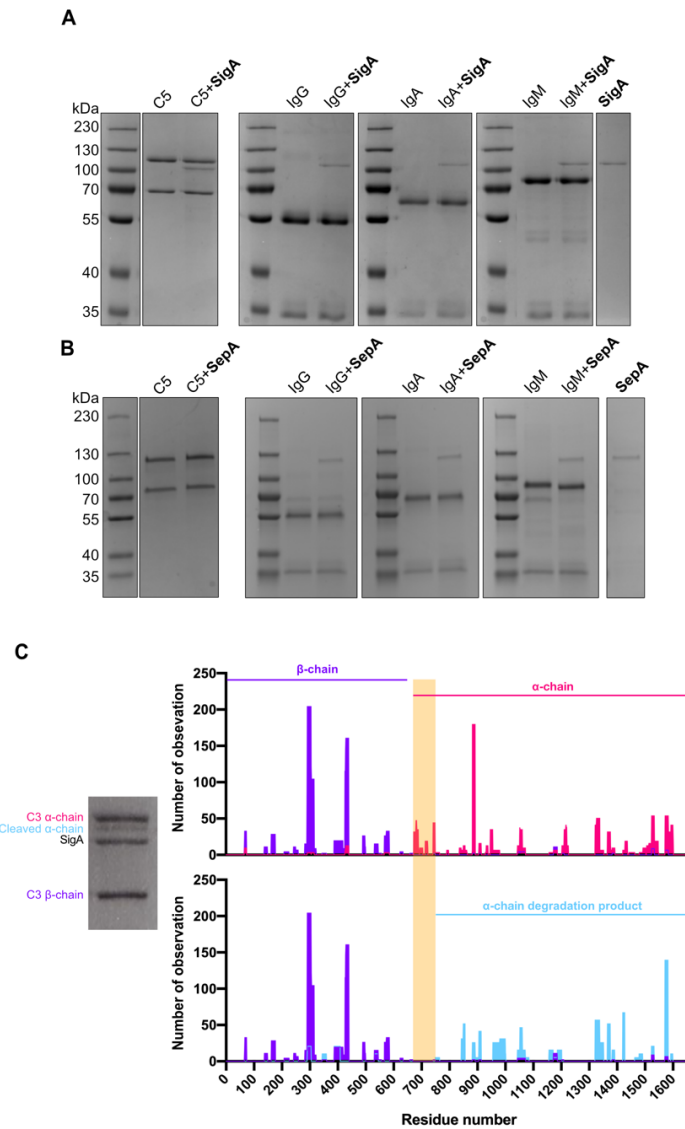


Figure S5. SigA and SepA substrate specificity and identification of SigA cleavage site on complement component 3 (C3)

(A) Commercially purified human complement component 5 (C5), immunoglobulin G (IgG), immunoglobulin A (IgA) and immunoglobulin M (IgM) were incubated with purified SigA or SepA at 37°C overnight. Samples were separated on a 10% SDS-PAGE gel and stained with Coomassie. (B) Complementary result to Fig. 3G. Human complement 3 component (C3) was incubated with purified SigA overnight at 37°C and proteins were separated on a 10% SDS-PAGE gel and stained with Coomassie (left panel). Each indicated band (C3 α -chain/ β -chain/cleaved α -chain) was analyzed by mass spectrometry. Purple residues correspond to the C3 β -chain, pink residues correspond to the C3 α -chain, and light blue residues correspond to the cleaved C3 α -chain. The orange area corresponds to the site of cleavage of C3 by SigA.

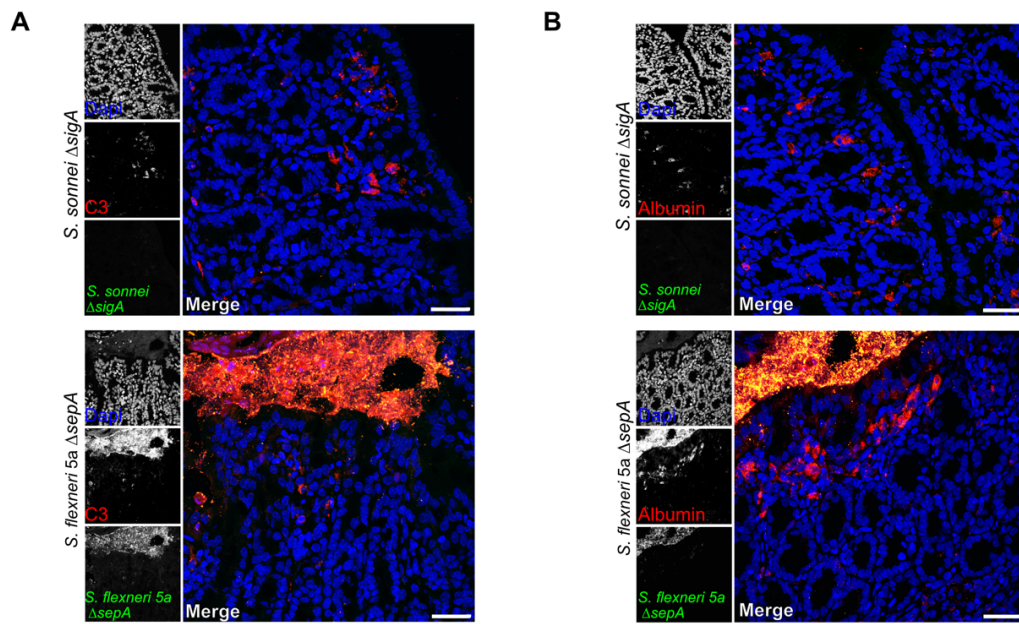


Figure S6. Complementary result to Fig. 4.

(A-B) Guinea pig colonic mucosa infected by *S. sonnei* $\Delta sigA$ and *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ strains (green) for 48h. Infected tissues were stained with an (A) anti-human complement C3 antibody or (B) an anti-human albumin antibody (red) and DNA was stained with Dapi. Bars, 50 μm .

Table S1 List of strains and plasmids

Strains	Description	Antibiotic resistance/inductor	Origin
<i>E. coli</i> K12	WT strain		Lab collection
<i>S. flexneri</i> 2a	WT strain		Lab collection
<i>S. flexneri</i> 5a	WT strain		Lab collection
BS176	Virulence plasmid-cured <i>S. flexneri</i> 5a		(1)
<i>S. sonnei</i> CNRS	Clinical isolate CIP106347	Streptomycin	Pasteur institute collection
<i>S. sonnei</i> Δ <i>sigA</i>	<i>S. sonnei</i> CNRS with <i>sigA</i> deletion	Streptomycin/Chloramphenicol	Lab collection
<i>S. flexneri</i> 5a Δ <i>sepA</i>	<i>S. flexneri</i> 5a with <i>sepA</i> deletion	Streptomycin/Chloramphenicol	Lab collection
<i>S. sonnei</i> Δ <i>sigA</i> pSigA3	<i>S. sonnei</i> Δ <i>sigA</i> mutant strain complemented with pSigA3	Streptomycin/Chloramphenicol /Ampicillin IPTG inductor	Lab collection
<i>S. flexneri</i> 5a Δ <i>sepA</i> pSepA	<i>S. flexneri</i> 5a Δ <i>sepA</i> strain complemented with pZK15	Chloramphenicol/Ampicillin IPTG inductor	Lab collection
BS176 pSepA	<i>S. flexneri</i> 5a virulence plasmid cured carrying pZK15	Ampicillin IPTG inductor	Lab collection
BS176 pSepA _{S211A}	<i>S. flexneri</i> 5a virulence plasmid cured carrying pSepA _{S211A}	Ampicillin IPTG inductor	Lab collection
<i>E. coli</i> HB101 pPic1	<i>S. flexneri</i> 5a virulence plasmid cured carrying pPic1	Tetracyclin	(2)
Plasmid	Description	Antibiotic resistance/inductor	Origin
pKD46	Plasmid carrying lambda red system	Ampicillin	(3)
pKD3	Plasmid carrying Cm resistance box	Chloramphenicol	(3)
pZK15	Plasmid carrying the <i>sepA</i> gene	Ampicillin	(4)
pS211A	Plasmid carrying the <i>sepA</i> gene with point mutation of 211 catalytic serine in alanine	Ampicillin	Mario Meza-Segura (5)
pSigA3	Plasmid carrying the <i>sigA</i> gene	Ampicillin IPTG	Mario Meza-Segura (5)
pPic	Plasmid carrying the <i>pic</i> gene	Tetracyclin	(2)
pGFP	Plasmid carrying the <i>gfp</i> gene, with constitutive expression (pFPV25.1)	Ampicillin	Lab collection

Table S2. Primers used in this study

Primer	Description	Sequence (5' à 3')	Size (bp)
Δ sigAsonFor1	Primers used for the deletion of <i>S. sonnei sigA</i> gene	GCTATCCCATAACCACAACCTCAGAAATATCGGAGTTCACG TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	61
Δ sigAsonRev1		CTACGGTAGAAGAAGGGCCGCAAACGCGGCCCGGGCTG TTAC CATATGAATATCCTCCTTAG	61
Δ sepA5aFor1	Primers used for the deletion of <i>S. flexneri 5a sepA</i> gene	CCTATGTAATTAATCTTTGTCAAAATTAGGTTGATGTTTCTA TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	62
Δ sepA5aRev1		CAGAAAAAGGCCTGCCGAATGGCAGGCCTATCCCATTCCG CATATGAATATCCTCCTTAG	59
Δ sigAsonk1	Primers used for the control of <i>sigA</i> and <i>sepA</i> deletion	GACCGGAAACAACAAAGATC	20
Δ sigAsonk2		GTGATGGCTTCCATGTCGGC	20
Δ sigAsonk3		GGCATGATGAACCTGAATCG	20
Δ sigAsonk4		GCGATATAGTCTGTCACAGG	20
seQsepAfor1		CCAGTCGGCAAACTAGTTG	20
seQsepArev1		CCAAACTGCCCTTATCGATACCG	24
qPCRrrsAF		qRT-PCR <i>rrsA</i>	AACGTCAATGAGCAAAGGTATTAA
qPCRrrsAR		TACGGGAGGCAGCAGTGG	18
qPCRgyrBF	qRT-PCR <i>gyrB</i>	GCAAGCCACGCAGTTTCTC	19
qPCRgyrBR		GCTGGTCAGCGAACTGAACG	20
qPCRsepAF	qRT-PCR <i>sepA</i>	GGTTATTCTTACGTCTGTTGCAGC	24
qPCRsepAR		CCATCGGGGCTTTATCAAGTTTACC	25
qPCRsigAF	qRT-PCR <i>sigA</i>	GCTGTTTCTGAACTGACCCGG	21
qPCRsigAR		GCACCCGGTCTGAACTCTCC	20
qPCRpicF	qRT-PCR <i>pic</i>	CGCCTCAGTATATCGTCAGC	20
qPCRpicR		TACCCACCCGATAAAAAGCG	20

SI References

1. P. J. Sansonetti, J. Mounier, Metabolic events mediating early killing of host cells infected by *Shigella flexneri*. *Microb. Pathog.* **3**, 53–61 (1987).
2. F. Ruiz-Perez, *et al.*, Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 12881–12886 (2011).
3. K. A. Datsenko, B. L. Wanner, One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 6640–6645 (2000).
4. Z. Benjelloun-Touimi, P. J. Sansonetti, C. Parsot, SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Mol. Microbiol.* **17**, 123–135 (1995).
5. M. Meza-Segura, *et al.*, SepA Enhances *Shigella* Invasion of Epithelial Cells by Degrading Alpha-1 Antitrypsin and Producing a Neutrophil Chemoattractant. *Mbio* **12**, e02833-21 (2021).

Discussion

La discussion de mes résultats principaux est incluse dans l'Article 1. Je prends ici le parti de discuter des principales questions qu'ont soulevées les résultats obtenus durant ma thèse et de proposer des approches expérimentales permettant d'y répondre. J'y aborderai également des expériences non fructueuses que j'ai réalisées, mais dont l'analyse méticuleuse des résultats permettra de formuler des hypothèses originales. Enfin je discuterai des résultats supplémentaires non publiés qui pourront être à l'origine du développement de nouveaux projets dans l'équipe d'accueil (**Figures S1-S4, p. 117-120**).

De nombreuses bactéries pathogènes sont capables d'entrer dans la circulation sanguine, et de se disséminer provoquant chez le patient une septicémie et souvent la mort (164). Premièrement j'ai démontré que *S. sonnei* et *S. flexneri* se co-localisent avec les vaisseaux sanguins CD31+/CD34+ dans la muqueuse colique suggérant leur capacité d'invasion de la barrière endothéliale des vaisseaux sanguins. Les mutants $\Delta sigA$ et $\Delta sepA$ n'étant pas co-localisés dans ces vaisseaux, l'importance de SigA et SepA dans la colonisation des cellules endothéliales et de la circulation sanguine a été révélée. Cependant, les mécanismes moléculaires permettant à *Shigella* d'entrer dans la circulation sanguine restent encore inconnus. Il sera donc intéressant de mener des expériences *in vitro* sur des lignées de cellules endothéliales humaines comme les HUVECs pour répondre à cette question grâce à des approches classiques (microscopie, cytométrie en flux, test de protection à la gentamycine) en utilisant les souches mutantes pour les SPATEs. Ces cellules ont été utilisées par exemple pour démontrer le caractère cytotoxique de l'exolysine ExlA retrouvée dans le surnageant d'une souche de *P. aeruginosa* hautement infectieuse ayant provoqué des hémorragies et une septicémie fatale chez un patient (204). Ces expériences pourraient également être menées par l'incubation des SPATEs purifiées avec les cellules endothéliales afin de déterminer leurs mécanismes de transport éventuel dans les cellules, ou leurs mécanismes d'action sur les cibles potentielles à la surface des cellules, comme effectué par P. Dutta *et al.* en 2002 avec EspC, EspP, Pet, Pic, Sat, Tsh, et SepA sur des cellules Hep-2 (205).

De plus, nous avons détecté du C3 et de l'albumine dans la muqueuse colique des cobayes infectés par *Shigella* ainsi que la formation d'abcès mettant en évidence les hémorragies induites par ce pathogène. Il serait intéressant ici de co-localiser dans les tissus de côlon le C3 et les SPATEs, à l'aide d'anticorps spécifiques produits, afin de confirmer, premièrement, où

ces protéases sont sécrétées dans la muqueuse colique et deuxièmement, comment elles interagissent *in vivo* avec le C3 dans cet environnement. En effet, à ma connaissance, une seule étude a été menée *in vivo* sur l'effet de Sat sur la septicémie induite par *E. coli* EC071 chez les souris. Les auteurs ont étudié l'effet d'une souche pathogène sécrétant Sat sur la létalité chez les souris, comparé à l'infection par une souche non pathogène. Les résultats montrent que les souris infectées par la souche produisant Sat meurent 2 jours après l'infection tandis que celles infectées par la souche non pathogène ne meurent pas, jusqu'à 7 jours post-infection (64). Cependant l'interaction *in vivo* de Sat avec les protéines du complément n'a pas été étudiée.

La détection des SPATEs *in vivo* dans un contexte d'infection n'a que peu été réalisée. Une étude a mis en évidence par PCR la distribution des SPATEs dans des souches ExPEC ayant provoqué des bactériémies. Cependant, c'est une étude génomique qui a été conduite ici (94). J'ai cherché durant ma thèse à détecter SigA et SepA *in vivo*. Malgré l'identification de souches de *S. sonnei*, *S. sonnei* Δ sigA pSigA, *S. flexneri* 5a et *S. flexneri* 5a Δ sepA pSepA dans le sang des cobayes après 48h d'infection, il n'a pas été possible de détecter SigA et SepA par Western blot dans le plasma de cobaye, en utilisant des anticorps de lapin anti-SigA et anti-SepA. Il est possible que la quantité de SPATEs soit tellement faible que la méthode de Western blot n'est pas assez sensible. Celle-ci pourrait être remplacée par un test ELISA par exemple. De plus, j'ai remarqué que la stabilité des SPATEs purifiées est très limitée dans le temps, notamment celle de SigA. En effet, après quelques jours, la quantité de SigA diminue drastiquement dans nos tubes, suggérant que la protéase pourrait s'autodégrader. Il est donc possible que les SPATEs effectivement sécrétées par *Shigella* dans le plasma aient été dégradées lors du stockage des échantillons (en fonction du temps et de la température par exemple).

Par ailleurs, nous essayons au laboratoire de développer un modèle animal plus simple d'utilisation. En effet, le modèle de cobaye carencé en ascorbate est robuste pour l'étude de la shigellose, mais les outils d'étude moléculaires restent limités. Notre laboratoire a tenté de valider un modèle de souris C57BL/6 dont le gène codant pour la L-gulonolactone- γ -oxydase a été délété (*gulo*^{-/-}). Ces souris KO ne sont plus capables de synthétiser naturellement l'ascorbate. Cependant, ces souris bien qu'étant plus sensibles à l'infection par *Shigella* à court terme, ne développaient pas, comme chez les cobayes, de signes cliniques de shigellose

marqués et prolongés dans le temps, même lorsque la dose infectieuse injectée était élevée (10^9 CFU par challenge oral ou intrarectal) (159). Ce modèle n'ayant pas été validé, nous avons gardé le modèle de cobaye pour mes expériences. À ce jour, nous ne savons toujours pas pourquoi les souris, dans la plupart des cas, sont insensibles à l'infection par *Shigella*.

J'ai également démontré que SepA et SigA sont essentielles à *S. flexneri* 5a et *S. sonnei* respectivement pour survivre et croître dans le plasma. Pour aller plus loin, j'ai prétraité le plasma pendant une nuit à 37°C avec des surnageants de culture de *S. sonnei* et *S. flexneri* 5a purifiés à l'ammonium sulfate et concentrés. Les SPATEs sont les protéines les plus abondantes dans les surnageants de *Shigella* et sont sécrétées sans stimuli. Ces plasmas prétraités ont donc été incubés pendant 0, 4h et 18h sur des pads d'agar en présence d'*E. coli* K12 comme effectué dans l'article 1. Comme les SPATEs inactiveraient le système du complément en clivant C3 et que *E. coli* K12 est sensible à celui-ci, alors nous nous attendons à ce que cette souche non pathogène survive et croit en présence de ces plasmas prétraités par les surnageants de *Shigella*. À cette expérience, j'ai obtenu 2 résultats différents.

Premièrement, lorsqu'*E. coli* est mis en contact avec du plasma prétraité avec le surnageant de *S. sonnei*, il ne survit pas et meurt après 30 min d'incubation (**Fig. S1a**). Ce résultat suggère qu'il y a dans le surnageant de *S. sonnei* un élément qui tue *E. coli*. Ce phénotype peut être expliqué par la présence de la colicine E1 dans le surnageant de notre souche de laboratoire *S. sonnei* CIP 106347, résultat qui a été confirmé en spectrométrie de masse lors de l'analyse du sécrétome de cette souche (**Fig. S1b**). En effet, dans l'article 2, nous avons démontré avec nos collaborateurs que les colicines de *S. sonnei* sont associées à la compétition et à la mort d'*E. coli*. Ce même test devrait être effectué avec un plasma prétraité avec le surnageant de *S. sonnei* $\Delta sigA$ pour discriminer l'effet de SigA sur *E. coli*. Si le même phénotype est observé, cela signifie que c'est bien la colicine de *S. sonnei* qui a provoqué le phénotype présenté en **figure S1a** et non SigA. Même si SigA a pu inactiver la protéine C3 dans le plasma prétraité, c'est la colicine qui a probablement provoqué la mort d'*E. coli* sur les pads. Ceci pourrait être confirmé en utilisant un mutant *S. sonnei* délété du gène codant pour la colicine E1.

Deuxièmement, lorsqu'*E. coli* est mis en contact avec du plasma prétraité avec le surnageant de *S. flexneri* 5a, il survit. Cela suggère que SepA est nécessaire à l'inactivation du plasma par l'effet de SepA sur la protéine C3 (**Fig. S1c**). Nous avons vu dans les résultats obtenus dans l'article 1, que lorsque le mutant *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ est mis en présence de plasma, celui-ci

arrive à survivre à l'action bactéricide du plasma (malgré un défaut de croissance significatif), de même que la souche BS176 ne possédant plus le plasmide de virulence portant le gène *sepA*. Ces résultats suggèrent que SepA est important à *S. flexneri* 5a pour survivre et croître en présence de plasma mais que ce n'est pas le seul élément qui lui confère cet avantage. En effet, lorsqu'*E. coli* est mis en présence de plasma prétraité par le surnageant de *S. flexneri* 5a $\Delta sepA$ (ne sécrétant pas SepA donc), il survit (**Fig. S1c**). Ceci démontre qu'un autre élément sécrété, différent de SepA, entre en jeu pour inactiver le plasma et que le gène codant pour cet élément se trouve potentiellement sur le chromosome de *S. flexneri* 5a et non sur le plasmide de virulence et qui n'est probablement pas présent chez *S. sonnei*.

Des expériences complémentaires sont donc nécessaires pour comprendre quel élément agit probablement en synergie avec SepA pour inactiver l'effet antibactérien du plasma humain sur *E. coli*. En effet, comme mentionné dans l'introduction, IcsP, une aspartyl-protéase de *Shigella* peut dégrader les protéines de C3 déposées à la surface de la bactérie dans le but de favoriser son élimination (105). Cependant, ce mécanisme n'a pas été relié à une survie du pathogène dans le plasma. Ici, la construction et l'utilisation d'un mutant $\Delta sepA/\Delta icsP$ serait intéressante pour déterminer la capacité de *Shigella* à survivre dans le plasma grâce à ces deux protéases agissant potentiellement en collaboration.

De plus il serait intéressant de prétraiter le plasma avec des SPATEs pures au lieu du surnageant pour discriminer les potentiels effets des contaminants sur l'action antibactérienne du plasma. Il a été démontré par un test de formation du complexe MAC que l'activité du complément est significativement réduite lorsque le sérum d'un patient a été mis en présence d'EspP qui dégrade le C5 (39). De même pour Pic, une étude a suggéré que cette protéase peut inactiver les 3 voies du système du complément (63).

Il a été mis en évidence que Pic, EspP et Sat clivent la protéine C3, protéine centrale du système du complément (39, 63, 64). Durant ma thèse, j'ai démontré le clivage de la protéine C3 du complément par SigA et SepA. Nous avons tenté de déterminer le site de clivage de SigA sur C3. Celui-ci se situerait dans la zone entre les acides aminés Met-680 et Arg-740 en N-term de la chaîne α de C3. Pour déterminer le site de clivage précis, une dégradation d'Edman serait la solution. Cette technique permet en commençant par l'extrémité N-term d'enlever un par un les résidus permettant de déterminer la séquence d'un fragment. En effet, une étude a mis en évidence par cette méthode qu'EspP clive C3b à deux endroits

différents générant 3 fragments inactifs de C3b (39). Des produits de dégradation de C3 par le clivage de SigA et SepA ont été observés sur les Western blots présentés en figure 3 de l'article 1. Le clivage de C3 par SigA produit 5 produits de dégradation : à 100 kDa, à 60 kDa, à 55 kDa, à 45 kDa et à 40 kDa. Le clivage de C3 par SepA produit 6 produits de dégradation : à 100 kDa, à 60 kDa, à 55 kDa, à 40 kDa, à 38 kDa, et à 37 kDa approximativement. Le clivage de C3 par les SPATEs semble complexe, c'est pourquoi il est nécessaire d'effectuer une dégradation d'Edman. Déterminer les sites de clivage de SigA et SepA sur C3 pourrait nous apporter des informations supplémentaires sur les peptides spécifiques qui sont ciblés par ces protéases à sérine. Il a été déterminé dans une étude que SepA a une affinité particulière pour les peptides suivants : Val-Pro-Phe et Ala-Pro-Leu (205). En effet, maintenant que nous avons déterminé la structure 3D prédictive de SigA, et que nous savons dans quel environnement structural se trouve le site catalytique, nous pouvons, sur la base d'analyses de différents substrats, prédire quelles pourraient être les autres cibles de cette SPATE.

Nous ne pouvons pas exclure également la présence d'un autre élément bactéricide dans le plasma qui n'est pas inactivé par les SPATEs. Pour étudier cela, nous pourrions observer l'effet de plasma déplété de C3 (plasma commercial) sur des pads avec les mutants $\Delta sigA$ et $\Delta sepA$ (et *E.coli*) ou l'effet de plasma qui aurait été préalablement co-immunoprécipité avec des anticorps anti-C3 spécifiques, afin de retirer tout le C3. Par ailleurs, nous ne savons pas dans quelle mesure les SPATEs clivent les protéines du complément et inactivent ce système. Il serait nécessaire de faire des tests d'activité du système du complément avec du plasma pré incubé avec les SPATEs pures. Il a été montré par un test de dépôt de C4b (CP et LP) et un test AP50 (AP) que Pic induit une diminution de 75% et 80% de l'activité des voies classique et des lectines respectivement, et une diminution d'environ 40% de la voie alternative (63). Par un test ELISA, Orth *et al.* ont mis en évidence un effet similaire de EspP sur ces 3 voies du complément dont l'activité est inhibé de moitié (39).

Le plasma récupéré à partir des tubes de sang obtenus à l'EFS a été mis en contact, lors du prélèvement, avec du citrate, un anticoagulant connu pour chélater les ions calcium notamment. Il est donc intéressant de noter ici que les ions calcium, étant essentiel aux voies CP et LP système du complément pour fonctionner, il est probable que l'activité de ces voies aient été impactée négativement dans nos échantillons de plasma. Alors, des expériences de pads d'agar ont été initiées au laboratoire, comme décrit dans l'article 1, cette fois en

présence de plasma complémenté avec 5mM de CaCl₂ et 5mM de MgCl₂ afin de rétablir l'activité de toutes les voies du complément dans nos échantillons. En parallèle ces expériences ont été initiées avec du sérum, qui a été récupéré à partir de sang prélevé dans des tubes dits « secs » (sans anticoagulant) et dont les 3 voies du complément sont actives. Les expériences sont encore en cours, et permettront de confirmer que le plasma utilisé dans l'article 1 avait un système du complément bien actif, et de comparer l'effet du plasma humain, du plasma humain complémenté avec 5mM de CaCl₂ et MgCl₂ et du sérum humain sur les souches de *Shigella* sauvages et mutantes pour les SPATEs ainsi que sur *E. coli* K12.

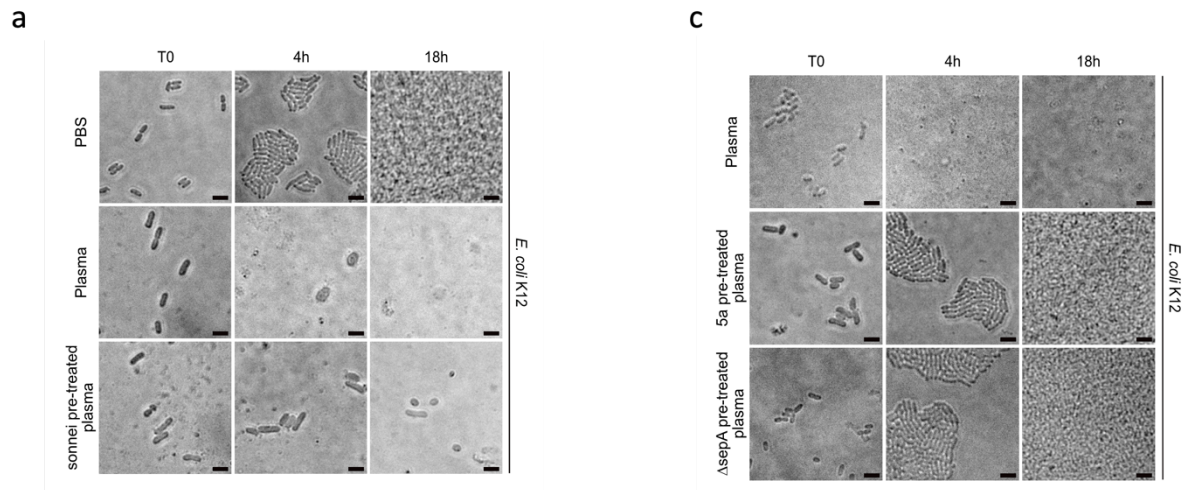
Concernant la méthode de quantification de la confluence des bactéries sur les pads, elle est encore à améliorer. En effet, le logiciel Image J (Fiji) a été utilisé pour calculer l'aire totale des bactéries (en pixels) par rapport à la surface totale de l'image. Cependant, la méthode de quantification par « *threshold* » utilisée sur Fiji, ne permet pas de discriminer les particules de plasma des bactéries dans les conditions en présence de plasma, et induit des biais de calcul lorsque le champ est flou (**Fig. S2a**). Par exemple sur la même image (selon comment est adapté le *threshold*) on peut obtenir une confluence de 2,83% de l'aire totale ou de 0,80% (**Fig. S2b**). J'ai donc initié le développement d'une méthode de *deep learning*, se basant sur l'utilisation de bactérie fluorescentes. Le *deep learning* est une méthode de *machine learning* qui permet d'apprendre à un ordinateur à effectuer une tâche qui est dite « naturelle » pour l'homme. Le but ici est d'acquérir la même image au microscope en lumière blanche (*brightfield* - BF) et en fluorescence (en utilisant des bactéries fluorescentes pGFP). Ainsi, en créant des « masks » sur le logiciel ilastik à partir des images fluorescentes, et en les superposant ensuite aux images de BF, l'ordinateur « apprend » que les pixels blancs du « *mask* » correspondent aux bactéries fluorescentes et les pixels noirs correspondent à l'arrière-plan (background + les particules de plasma) (**Fig. S2c**). Si on prend un data-set de 100 images par exemple, 80% des images serviront à entraîner le modèle et les 20% des images restantes serviront à valider la robustesse de ce modèle en choisissant une valeur de fiabilité. Plus l'ordinateur reçoit d'images pour s'entraîner, moins il fera d'erreur et cela permettra de discriminer les particules de plasma dans les calculs de confluence de bactéries. Ce modèle est encore en développement. Le but est de créer un *plugin* qui sera ajouté sur le logiciel Fiji afin de permettre aux utilisateurs de calculer la confluence des bactéries sur des

images de BF en présence d'une molécule de traitement (comme le plasma) sans induire de biais.

Pour finir, les SPATEs de *Shigella* sont des protéases à sérine dont la séquence du domaine *passenger* est assez conservée : les pourcentages d'identité sont compris entre 51 et 57% (**Fig S3a**) (42). L'alignement des séquences des domaines *passenger* de SigA, SepA et Pic fait ressortir un domaine bien conservé de 19 acides aminés qui est exposé en partie à la surface de la protéine (**Fig. S3b**). Nous avons donc voulu tester la cross-réactivité des anticorps de lapin anti-SPATE que nous avons fait produire à partir de SPATEs purifiées et actives au laboratoire. Selon les résultats présentés en **figure S4**, il semblerait que les anticorps anti-Pic et anti-SigA reconnaissent SepA, mais que l'anticorps anti-Pic ne reconnaît pas SigA et l'anticorps anti-SigA ne reconnaît pas Pic. Il y a donc de potentielles cross-réactivité entre les différents anticorps pour les SPATEs. Des analyses structurales plus poussées sur la base des structures cristallisées et les structures 3D prédictives des SPATEs permettront de déterminer des épitopes communs potentiels entre ces trois protéases.

En conclusion, les SPATEs de *Shigella* sont des facteurs de virulence de la bactérie qui lui sont utiles pour coloniser la barrière épithéliale intestinale et contourner les mécanismes immunitaires de l'hôte. Des études complémentaires permettront de savoir si une partie des SPATEs peut rester exposée à la membrane de la bactérie et si un pan-vaccin contre toute les *Shigella* sur la base d'un domaine conservé de SPATE pourrait être efficace. Si c'est le cas, alors ces protéines pourraient être de très bons candidats pour le développement de vaccins et ainsi limiter la propagation des *Shigella* dans les pays les plus touchés par la shigellose.

Résultats supplémentaires



b

Accession	Gene names	Description	BASIC Spectral Count (#spectra)							
			<i>S. sonnei</i> WT				<i>S. sonnei</i> Δ sigA			
			1	2	3	4	1	2	3	4
tr A0A656BWQ2 A0A656BWQ2_SHISO	cea	Colicin-E1* OS=Shigella sonnei OX=624 GN=cea PE=3 SV=2	240	404	422	682	338	434	323	322
tr A0A0H8V525 A0A0H8V525_SHISO	cea ERS009857_04095	Colicin E1 protein OS=Shigella sonnei OX=624 GN=cea PE=3 SV=1	180	309	325	741	278	353	262	253
sp P21178 CEA1_SHISO	pet sigA BZ172_07260 DOT86_21635 ERS009867_03604 HY120_18995 IC759_08670 SAMEA2056891_03760	Autotransporter outer membrane beta-barrel domain-containing protein OS=Shigella sonnei OX=624 GN=pet PE=4 SV=1	699	1006	1397	1610	0	0	0	0

Figure S1 : Effet du plasma prétraité par les surnageants de *S. sonnei*, *S. flexneri* 5a et *S. flexneri* 5a Δ sepA sur la croissance d'*E. coli* K12. (a) *E. coli* K12 a été incubé pendant 0, 4 et 18h à 37°C en présence de PBS, de plasma, et de plasma qui a été prétraité O/N à 37°C avec du surnageant de *S. sonnei*. (b) Confirmation par spectrométrie de masse de la présence de la colicine E1 dans nos souches de *S. sonnei* WT et *S. sonnei* Δ sigA. (c) *E. coli* K12 a été incubé pendant 0, 4 et 18h à 37°C en présence de plasma et de plasma qui a été prétraité O/N à 37°C avec des surnageants de *S. flexneri* 5a et *S. flexneri* 5a Δ sepA.

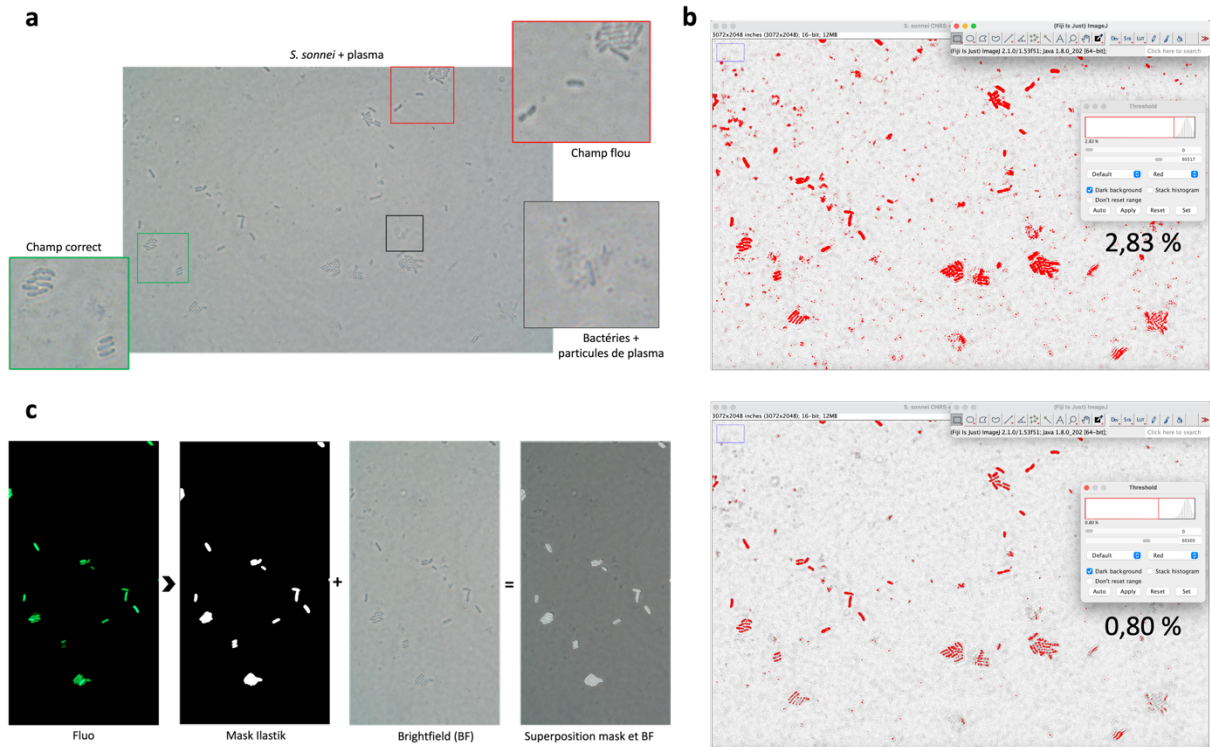


Figure S2 : Développement d'une méthode robuste de quantification de la confluence bactérienne. (a) Image type obtenue avec la méthode d'imagerie sur les pads. Il y a des champs corrects (vert), des champs flous (rouge) et la présence de particules de plasma (noire). (b) Biais induits par la méthode de quantification par « *threshold* » sur Fiji. La quantification de l'image du haut donne une confluence de 2,83% et la quantification de l'image du bas donne une confluence de 0,80%. (c) Processus de développement d'une méthode plus robuste basé sur l'apprentissage de l'ordinateur (*deep learning*) à partir d'images en *brightfield* et de « *masks* » générés à partir d'ilastik.

a

	SigA	Pic	SepA
SigA		51%	51%
Pic	51%		57%
SepA	51%	57%	

b

```

SepA YNNGQMITAQTGDI FNPANGPLANYLNMGDSGSP LFAYDSLQKKWVLIGVLSSTNYG--
Pic LISDATIVSNPGQTYNPNVNGPLPDY GAPSPLFAYDKQKKWIVAVL RAYAGINGA
SigA SASLFNLDWKNKSYIYTNRTPFKNSPIFGDSGSGSYLYDKEQQKWV FHVSTVGF LSSIT
. : : . . . * : : ***** : **.* :***: .* : .

SepA -NNWVVTQDFLQQPQNDFDKTIA YTSGEGVLQWKYDAANGTGTLTQGN TTDWMHGKKG
Pic TNWNWV IPTDYL NQVMQDDFDAPVDFVSGLGPLNWTYDKTSGTGTLSQGSKNW TMHGQKD
SigA NIAWTN-----YSLFNNILVNNLKKNFNTMQLDGKKQELSSI IKD
* : . * . . . : *.. *

SepA NDLNAGKLLFTGNNGEVVLQNSVNQ GAGYLQFAGDYRVSA LNG-QTWMGGGIITDKGTH
Pic NDLNAGKNLVFSQNGAIILKDSVTQ GAGYLEFKDSYTVSAESG-KTWTGAGIITDKG TN
SigA KDL SVSC-----GGELTLKQD TDLGIGGLIFDKNQTYKVY GKDKSYRGAGI DIDNNTT
:*... . * : **:.. * * * * . .. : : *..* * :.*

SepA VLWQVNGVAGDNLHKTGEGTLV NNGTGVNAGGLKVG DGTVILNQADADGKVQAFSSVGI
Pic VTWKVNGVAGDNLHKLGEGLT INGTGVNPGGLKTDGDI VVLNQADTAGNIQAFSSVNL
SigA VEWNVKGVAGDNLHKIGSGTL DVKIAQGN--NLKIGNGTVILSAEKAFNKIYMAGGKGTV
* * : * : ***** * .*** : : * . ** * : * : * . : * .. :

```

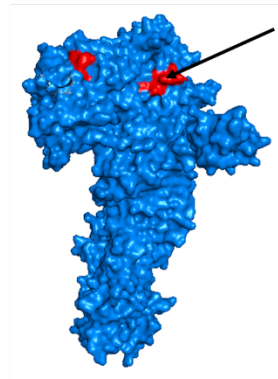


Figure S3 : Épitope conservé dans le domaine passager de SigA, SepA et Pic. (a) Tableau des pourcentages d'identité des séquences protéiques des domaines passager de SigA, Pic et SepA. **(b)** Alignement des séquences des domaines passager de SepA (Y237 à I472), Pic (L228 à L466) et SigA (S228 à V439). La séquence GDSGS en rouge correspond à la séquence conservée chez les SPATEs avec le premier S qui est la sérine catalytique. La séquence en rouge dans l'encadré correspond à une séquence de 19 aa conservée dans les 3 domaines passager des SPATEs de Shigella. La représentation 3D réalisée sur PyMol correspond à celle de SepA en mode « surface », avec en rouge au bout de la flèche noire le domaine de 19 aa conservé.

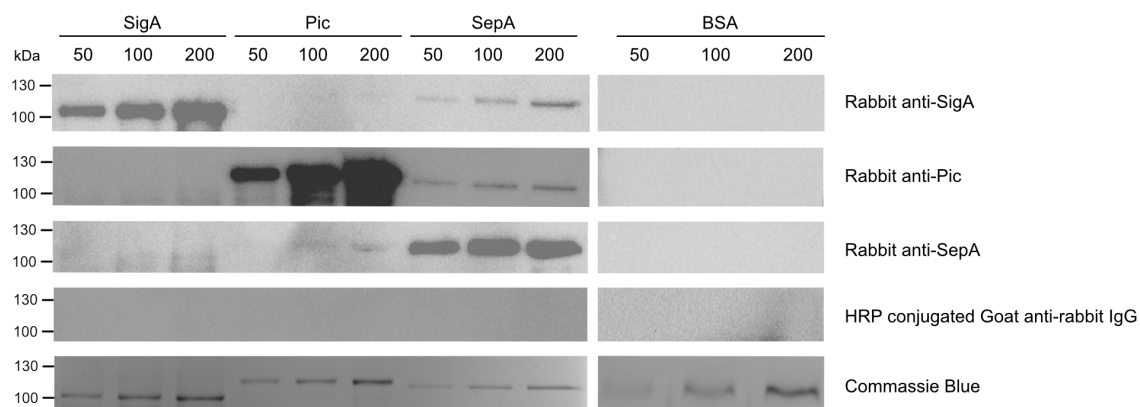


Figure S4 : Western blot de la cross réactivité des anticorps anti-SPATEs. Les SPATEs ont été purifiées, quantifiées et déposées à 50, 100 et 200 ng dans un gel SDS-PAGE 10% puis transférées sur une membrane de PVDF. Le marquage a été effectué avec des anticorps primaires de lapin : anti-SigA au 1/250^e, anti Pic au 1/500^e et anti-SepA au 1/500^e. Ensuite, 1/10 000^e d'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin a été ajouté. Ce même anticorps a également été ajouté en tant qu'anticorps primaire pour valider la spécificité des anticorps anti-SPATEs. La BSA à la même concentration que les SPATEs a été ajoutée en tant que contrôle et marquée dans les mêmes conditions.

Annexes

Review 1 : The selective advantage of facultative anaerobes relies on their unique ability to cope with changing oxygen levels during infection.

(Publiée dans le journal *Cellular Microbiology* le 19 Mars 2021)

Introduction

Les bactéries sont adaptées aux micro-environnements qu'elles rencontrent durant leur cycle de vie, qu'elles soient des pathogènes ou non. Il existe une classification de ces micro-organismes en fonction de leur capacité à survivre et/ou de se développer en présence ou en l'absence d'oxygène. Il existe 5 groupes différents : les aérobies stricts qui ont besoin d'oxygène pour se développer, les anaérobies stricts qui ne se développent pas en présence d'oxygène, les anaérobies aérotolestants qui sont insensibles à l'exposition à l'oxygène mais qui ne l'utilisent pas pour se développer, les microaérophiles se développant seulement en présence de faibles taux d'oxygène, et les anaérobies facultatives qui peuvent se développer en présence ou en l'absence d'oxygène. Ces dernières possèdent une capacité unique à s'adapter et à se développer dans des conditions variables d'oxygénation, notamment au cours des processus d'infection, faisant des anaérobies facultatifs, les pathogènes les plus représentés dans la liste des agents pathogènes prioritaires résistants aux antibiotiques de l'OMS. Cet avantage que possède l'anaérobie facultatif repose sur l'expression d'une chaîne respiratoire aérobie et d'une chaîne respiratoire anaérobie.

Dans la revue I, nous avons mis en lumière la manière dont les bactéries pathogènes s'adaptent à l'exposition à différents niveaux d'oxygène lors des processus infectieux afin de favoriser leur survie au sein de l'hôte, faisant des anaérobies facultatifs, leurs plus adaptées. En effet, qu'elles aient un mode de vie intra ou extracellulaire, ces pathogènes peuvent induire l'hypoxie dans les tissus infectés provoquant chez l'hôte une modulation de la défense immunitaire.

MICROREVIEW

WILEY

The selective advantage of facultative anaerobes relies on their unique ability to cope with changing oxygen levels during infection

Antonin C. André^{1,2} | Lorine Debande¹ | Benoit S. Marteyn^{1,3,4} 

¹Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Architecture et Réactivité de l'ARN, CNRS UPR9002, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

²Université de Paris, Paris, France

³University of Strasbourg Institute for Advanced Study (USIAS), Strasbourg, France

⁴Institut Pasteur, Unité de Pathogenèse des Infections Vasculaires, Paris Cedex 15, France

Correspondence

Benoit S. Marteyn, Université de Strasbourg, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Architecture et Réactivité de l'ARN, CNRS UPR9002, F-67000 Strasbourg, France
University of Strasbourg Institute for Advanced Study (USIAS), Strasbourg, France

Institut Pasteur, Unité de Pathogenèse des Infections Vasculaires, 28 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.
Email: marteyn@unistra.fr; marteyn@pasteur.fr

Funding information

ANR JCJC, Grant/Award Number: ANR-17-CE15-0012; USIAS fellowship

Abstract

Bacteria, including those that are pathogenic, have been generally classified according to their ability to survive and grow in the presence or absence of oxygen: aerobic and anaerobic bacteria, respectively. Strict aerobes require oxygen to grow (e.g., *Neisseria*), and strict anaerobes grow exclusively without, and do not survive oxygen exposure (e.g., *Clostridia*); aerotolerant bacteria (e.g., *Lactobacilli*) are insensitive to oxygen exposure. Facultative anaerobes (e.g., *E. coli*) have the unique ability to grow in the presence or in the absence of oxygen and are thus well-adapted to these changing conditions, which may constitute an underestimated selective advantage for infection. In the WHO antibiotic-resistant 'priority pathogens' list, facultative anaerobes are overrepresented (8 among 12 listed pathogens), consistent with clinical studies performed in populations particularly susceptible to infectious diseases. Bacteria aerobic respiratory chain plays a central role in oxygen consumption, leading to the formation of hypoxic infectious sites (infectious hypoxia). Facultative anaerobes have developed a wide diversity of aerotolerance and anaerotolerance strategies in vivo. However, at a single cell level, the modulation of the intracellular oxygen level in host infected cells remains elusive and will be discussed in this review. In conclusion, the ability of facultative bacteria to evolve in the presence or the absence of oxygen is essential for their virulence strategy and constitute a selective advantage.

Take Away

- Most life-threatening pathogenic bacteria are facultative anaerobes.
- Only facultative anaerobes are aerotolerant, anaerotolerant and capable of consuming O₂.
- Facultative anaerobes induce and are well adapted to cellular hypoxia.

KEYWORDS

facultative anaerobes, oxygen, hypoxia

1 | INTRODUCTION

Bacteria, including those that are pathogenic, are generally classified according to their ability to survive and grow in the presence or absence of oxygen: aerobic and anaerobic bacteria, respectively. Strict aerobes require oxygen to grow (e.g., *Neisseria*), strict anaerobes grow

exclusively without, and do not survive oxygen exposure (e.g., *Clostridia*) while aerotolerant anaerobes (e.g., *Lactobacilli*) are insensitive to oxygen exposure. Microaerophilic bacteria are adapted to sub-atmospheric levels of oxygen, but do not survive its absence (e.g., *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*) (Bury-Moné et al., 2006; Krieg & Hoffman, 1986).

The objective of this review is to decipher how pathogenic bacteria cope with oxygen exposure when infecting human cells and tissues; we focus here on their survival capacity and potential strategies to manipulate oxygen levels to optimise their fitness within infectious sites, facing changing oxygen levels. For this purpose, we propose a new classification of pathogenic bacteria, in regards to their oxygen- or non-oxygen-consumption capacity, their aero- or anaero-tolerance and their aero- or anaero-sensitivity.

Aerotolerant bacteria are strict aerobes, facultative anaerobes, aerotolerant anaerobes and, to some extent, microaerophilic bacteria. Aerosensitive bacteria are only strict anaerobes. Anaerotolerant bacteria are strict anaerobes, facultative anaerobes and aerotolerant anaerobes. Oxygen-consuming bacteria are strict aerobes, facultative

anaerobes and microaerophilic bacteria. Non-oxygen-consuming bacteria are strict anaerobes and aerotolerant anaerobes (Figure 1a). This classification highlights the selective advantage of facultative anaerobes in regards to their survival capacity in the presence or absence of oxygen and their ability to consume it; facultative anaerobes are the lonely oxygen-consuming, aerotolerant and anaerotolerant bacteria (Figure 1a). As an illustration, among the 12 antibiotic-resistant 'priority pathogens' listed by the World Health Organisation (WHO) in 2017, 8 pathogens are facultative anaerobes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonellae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella* spp.) (Tacconelli et al., 2017) (Figure 1b). This proportion has been reported in various epidemiological studies, including the

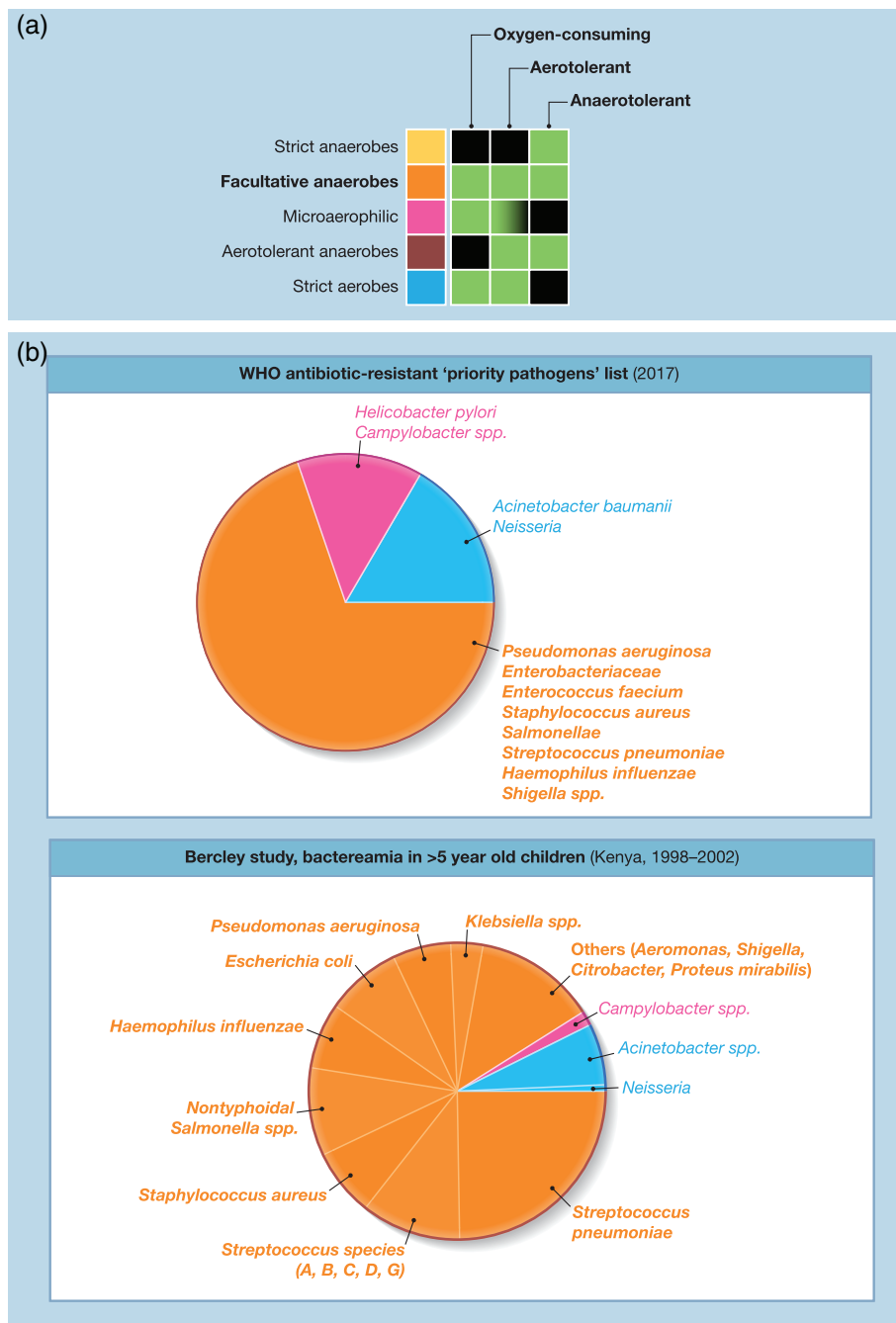


FIGURE 1 The selective advantage facultative anaerobes. (a) Schematic representation of oxygen consumption, aerotolerance and anaerotolerance capacity of pathogenic bacteria groups. Five main groups of bacteria are defined: strict anaerobes (yellow), facultative anaerobes (orange), microaerophilic bacteria (magenta), aerotolerant anaerobes (brown) and strict aerobes (blue). (b) Facultative anaerobes are overrepresented among life-threatening human pathogenic bacteria ('priority pathogen' for antibiotic resistance WHO list published in 2017) and (b) in the Berkley study performed in Kenya (1998–2002), in which bacteraemia-responsible pathogenic bacteria have been identified in children under the age of five (Berkley et al., 2005)

Berkley clinical study performed in Kenya between 1998 and 2002, showing that 85% identified pathogens responsible of bacteraemia in children under the age of five were facultative anaerobes (including *Escherichia coli*, non-typhoid salmonella species, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*) (Berkley et al., 2005) (Figure 2b).

As a conclusion, facultative anaerobes represent the most threatening pathogenic bacteria for humans.

2 | MOLECULAR MECHANISMS SUSTAINING FACULTATIVE ANAEROBES OXYGEN-CONSUMPTION

Facultative anaerobes constitute a unique bacteria group able to consume oxygen and to grow in the presence or absence of oxygen (Figure 1a), due to the expression of two respiratory chains using either oxygen or alternative

electron acceptors—referring to aerobic and anaerobic respiratory chains—as reviewed in Uden and Trageser (1991)). On an evolutionary perspective, and in regards to oxygen exposure, facultative anaerobes may be considered as the most evolved bacteria species for their capacity to disseminate within any microenvironment encountered during infectious processes.

Bacterial infections start with the invasion of perfused organs, under normoxia, which may be associated with different oxygen levels, depending on the targeted organ. High oxygen levels are encountered in highly perfused organs (e.g., liver, kidneys) or relatively low levels in poorly perfused ones (e.g., colon).

Upon infection, the basal organ level of oxygen will be modulated due to recruited immune cells' need for oxygen and bacteria oxygen-consumption activity; their respective contribution to the induced infectious hypoxia remains currently debated.

The main cause of bacteria-mediated oxygen consumption is aerobic respiration, which is functional in facultative anaerobes, microaerophilic

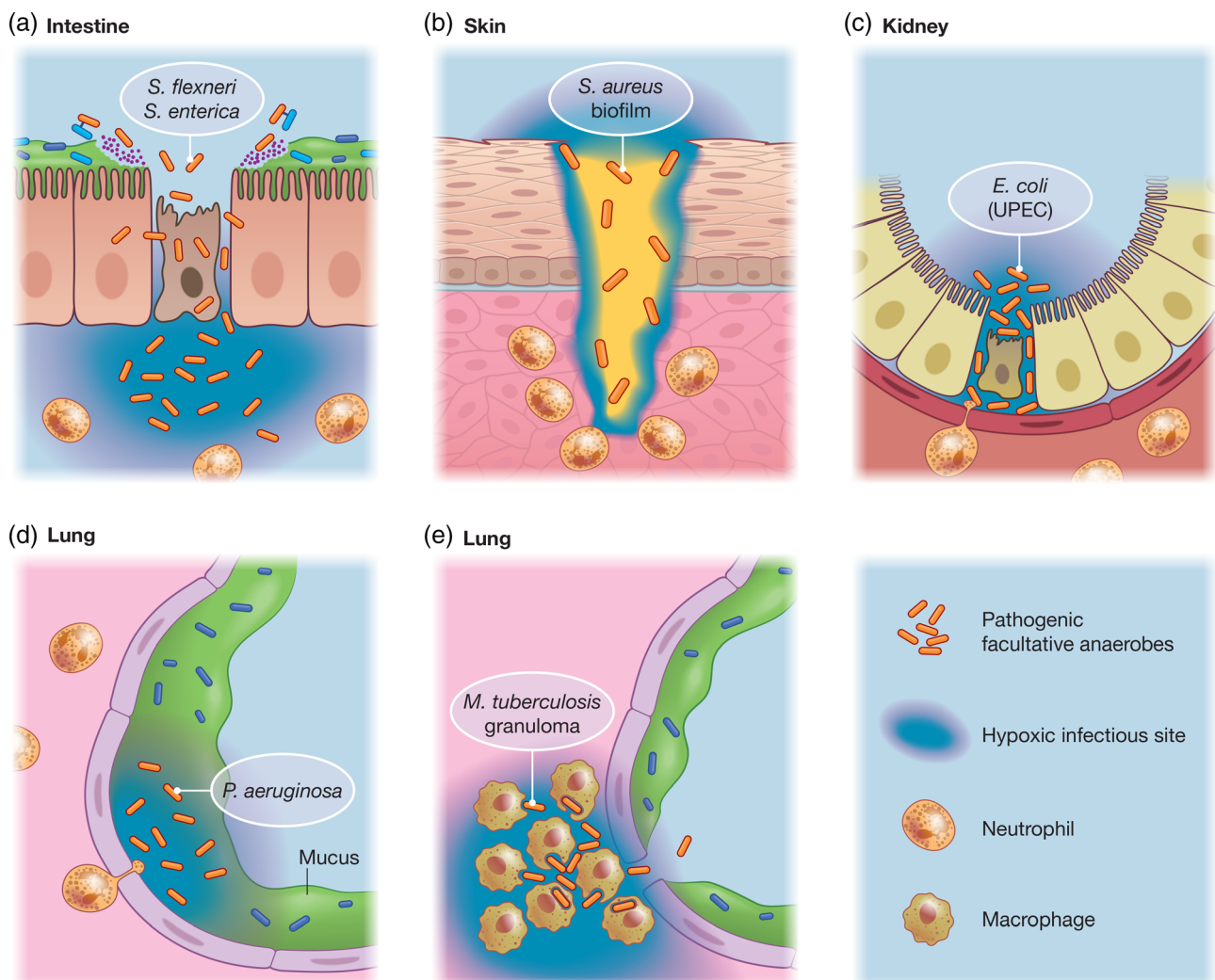


FIGURE 2 Hypoxic infectious foci induced in during facultative anaerobes. Hypoxic foci of infection were reported upon (a) intestine infections by *Salmonella enterica* (Jennewein et al., 2015) and *Shigella flexneri* (Arena, Tinevez, Nigro, Sansonetti, & Marteyn, 2017; Tinevez et al., 2019), (b) dermal infections, within biofilms formed by *Staphylococcus aureus* (Lone et al., 2015a; Lone et al., 2015b), (c) kidney infections by *Escherichia coli* (Melican et al., 2008) and (d) pulmonary infections by *Pseudomonas aeruginosa* (Worlitzsch et al., 2002) and (e) *Mycobacterium tuberculosis* granuloma (Klinkenberg, Sutherland, Bishai, & Karakousis, 2008; Peterson et al., 2020)

bacteria and strict aerobes. Aerobic respiration relies on electron transfer from various substrates through protein complexes located in the bacteria inner membrane encompassing dehydrogenases, electron carriers such as cytochrome C and Quinol, leading to dioxygen reduction by the last complex of the respiratory chain belonging to the terminal oxygen reductase family. The biological function, composition and regulation of bacteria aerobic respiratory chains are complex and diverse. Here, the diversity of oxygen reductases, which are directly involved in oxygen consumption, will be described. For other aspects, we refer to recent and complete reviews on the bacteria aerobic respiratory chain (Cook, Greening, Hards, & Berney, 2014; Kracke, Vassilev, & Krömer, 2015; Melo & Teixeira, 2016). Terminal oxygen reductases are reduced by cytochrome C (one-electron donor) or quinol (QH₂, two-electron donor) to allow the four-electron reduction of dioxygen to water, defining three families of oxygen reductases: the heme-copper oxygen reductase family (HCO), the alternative oxidase family (AOX) and the cytochrome *bd* family (Borisov, Gennis, Hemp, & Verkhovskiy, 2011). HCO is composed of cytochrome *c* oxidases and quinol oxidases. AOX and cytochrome *bd* oxidases receive electrons from quinol, not cytochrome *c*. To our knowledge, no AOX has been identified in major human pathogenic bacteria.

HCO are related to the mitochondrial complex IV. HCOs contain a high-spin heme (*a*₃, *o*₃ or *b*₃) and a copper ion at the oxygen-reduction site. Three HCO groups have been characterized: cytochrome *aa*₃ oxidase (HCO Type A oxygen reductase), cytochrome *ba*₃ and *b(o)a*₃ oxidases (HCO Type B oxygen reductases), and cytochrome *cb*₃ and *bcc*₃ oxidases (HCO Type C oxygen reductase) (Pereira, Santana, & Teixeira, 2001; Sousa et al., 2012). Cytochrome *bo*₃ oxidases use quinol as an electron donor, *cb*₃, *bcc*₃ and *aa*₃ oxidases are reduced by cytochrome *c* (Cook, Greening, et al., 2014). All pathogenic bacteria express at least one HCO (see below).

Cytochrome *bd* oxidases are quinol oxidases, which may use ubiquinol or menaquinol as substrates, and are phylogenetically distinct to mitochondrial enzymes. They do not contain copper or non-heme iron and are composed of two subunits (I and II); hemes *b*₅₉₅ and *d* are associated at the dioxygen reduction site (Borisov et al., 2011). Cytochrome *bd* oxidases are expressed by most pathogenic bacteria, some expressing several; their expression is induced under low-oxygen or stressful conditions, which may have a significant relevance during the infectious process.

Among oxygen-consuming bacteria listed as 'priority pathogens' by the WHO, *Pseudomonas aeruginosa* expresses 5 oxygen reductases (*aa*₃, *cb*₃ [x2], *bo*₃, and *bd*) (Arai, 2011; Yamanaka, Fukumori, Yamazaki, Kato, & Nakayama, 1985) (Hirai, Osamura, Ishii, & Arai, 2016), Enterobacteriaceae express 3 complexes (*bo*₃ and *bd* [x2]), including *Salmonella* (Jo, Cortez, Cornell, Price-Whelan, & Dietrich, 2017) (Jünemann, 1997). *Campylobacter* spp. and *Staphylococcus aureus* express two complexes (*bd/bcc*₃ and *aa*₃/*bd*, respectively) (Jackson et al., 2007) (Smith, Finel, Korolik, & Mendz, 2000) (Hammer et al., 2013), similarly to *Shigella* spp. (*bdl* (CydABX) (VanOrsdel et al., 2013) and *bdII* (AppBC) (Tinevez et al., 2019). Other pathogenic bacteria express only one oxygen reductase, including *Neisseria* (*cb*₃), *Helicobacter pylori* (*bcc*₃) and *Enterococcus faecium* or *Streptococcus pneumoniae* (*bd*) (Nagata, Tsukita, Tamura, & Sone, 1996) (Deudom, Koomey, &

Moir, 2008) (Hopper, Tovell, & Cole, 2009) (Ekici, Pawlik, Lohmeyer, Koch, & Daldal, 2012) (Winstedt, Frankenberg, Hederstedt, & von Wachenfeldt, 2000). *Mycobacterium tuberculosis* expresses two oxygen reductases (*bd* and the super-complex *bcc-aa*₃) (Cook, Hards, Vilchêze, Hartman, & Berney, 2014).

Listing oxygen reductases from the bacterial genome is probably insufficient to assess their function and role during infectious processes. It has been demonstrated that pathogenic *E. coli* aerobic respiration is required to colonise mice. ATP synthase defective mutants or cytochrome *bd* oxidase mutants fail to colonise; those with defective nitrate reductase or fumarate reductase have the same phenotype. These results highlight the importance of the combination of aerobic and anaerobic respiration—a 'respiratory flexibility'—for bacteria virulence (Jones et al., 2007).

Other bacteria-signalling pathways are associated with oxygen consumption, such as the Nitric Oxide (NO) synthesis, catalysed by the bacterial bNOS, as reviewed elsewhere (Hutfless, Chaudhari, & Thomas, 2018). However, the oxygen-consumption rate associated to this reaction seems to be negligible compared to the aerobic respiration. As an illustration, a mutation in *Shigella flexneri* cytochrome *bdI* oxidase (CydAB) totally abolishes its ability to consume oxygen, turning a facultative anaerobe into an aerotolerant strict anaerobe (Tinevez et al., 2019).

More recently, an extracellular electron transfer (EET) chain has been identified in several Gram-positive bacteria, including *Listeria monocytogenes* (Light et al., 2018), supporting the idea that alternative oxygen-consuming signalling pathways remain to be discovered. EET allows electron transfer from the cytosol to extracellular Iron (from NAD⁺ to DMK and PplA), supporting *L. monocytogenes* growth under anaerobic conditions. This alternative electron transfer pathway has been elegantly minded and described. However, it remains for now unclear whether oxygen may be a substrate for EET; its potential contribution to oxygen depletion during bacterial infection should be carefully investigated.

3 | ANAEROTOLERANCE FAVOURS BACTERIA SURVIVAL TO INFECTIOUS HYPOXIA

Anaerotolerance may be defined by the ability of bacteria to survive to the absence of oxygen. *Stricto sensu*, anaerotolerance may be defined by the ability of bacteria to grow in the absence of oxygen or to survive oxygen exposure. Facultative anaerobe's anaerotolerance is crucial for pathogenic bacteria belonging to this family since infectious hypoxia induction has been reported to be induced during their colonisation of host organs (*Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, UPEC, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*) (Jennewein et al., 2015; Lone et al., 2015a; Lone et al., 2015b; Peterson et al., 2020; Tinevez et al., 2019; Worlitzsch et al., 2002).

Bacteria growth under anoxic conditions essentially relies on the expression of an anaerobic respiratory chain composed of terminal electron acceptor complexes such as nitrate reductase, nitrite

reductase or fumarate reductase, which ultimately mediate electron transfer to nitrate, nitrite or fumarate (among others), respectively (reviewed in (Cook, Greening, et al., 2014; Cook, Hards, et al., 2014)). Energy production is therefore independent of oxygen availability. Facultative anaerobes, aerotolerant anaerobes and strict anaerobes express a functional anaerobic respiratory chain supporting their anaerotolerance and their growth in the absence of oxygen. Conversely, anaerobic microaerophilic bacteria or strict aerobes do not express a functional anaerobic respiratory chain.

Other anaerotolerance strategies have been developed among pathogenic bacteria, which have the ability to evolve and propagate under hypoxia. *L. monocytogenes*' extracellular electron transfer (EET) may be considered as an alternative anaerotolerance strategy (Light et al., 2018), together with alternate respiratory polyketide quinones in *Mycobacterium tuberculosis*, specifically expressed in biofilms and other oxygen-limited conditions (Anand et al., 2015). This pathogen is an obligate aerobe but colonises the host and persists under an oxygen-resistant latent state within hypoxic granulomas (Tsai et al., 2006) (Klinkenberg et al., 2008) (Figure 2). *Mycobacterium tuberculosis* do not grow in the absence of oxygen; this dormant state should rather be defined as an 'anaeroprotective' strategies to survive in the absence of oxygen (reviewed in Singh, Ghosh, Islam, Dasgupta, and Kirsebom (2010)) and Rustad, Sherrid, Minch, and Sherman (2009).

4 | BACTERIA AEROTOLERANCE STRATEGIES TO SURVIVE O₂ AND ASSOCIATED ROS EXPOSURE

Dioxygen is not toxic for bacteria per se. However, its presence is associated with the formation of highly toxic derivatives such as reactive oxygen species (ROS), including oxygen-superoxide radical (O₂^{•-}), hydrogen peroxide (H₂O₂) or hydroxyl radical (HO[•]). These reactive molecules may damage bacteria components (DNA, peptides and lipids) if not detoxified, and may be converted within infectious sites into more stable and more potent microbicidal molecules, such as hypochlorous acid (HOCl) by host immune cells, including polymorphonuclear neutrophils (Klebanoff, Kettle, Rosen, Winterbourn, & Nauseef, 2013).

The dissemination of oxygen-consuming bacteria, such as facultative anaerobes, is anticipated to contribute to the limitation of oxygen levels at infectious sites, hence limiting ROS production. We recently demonstrated that *Shigella flexneri* aerobic respiration mediates oxygen depletion in vivo (Arena et al., 2017; Tinevez et al., 2019) (Figure 2).

In addition, bacteria have evolved to detoxify ROS produced by host immune cells during the inflammatory response (reviewed in (Khademian & Imlay, 2021)). Several ROS detoxification pathways have been identified in bacteria, such as hydrogen peroxide-inducible genes activator (OxyR) (Choi et al., 2001) in response to H₂O₂ in *Shigella flexneri*, *Salmonella* (Jennewein et al., 2015) or *Pseudomonas aeruginosa* (Wei et al., 2012). The combination of the superoxide dismutase (SOD) and catalase activities mediates the detoxification of

O₂^{•-} to produce H₂O and O₂. Strict anaerobes, such as *Clostridium difficile*, may resist ROS with a key role by the sigma-B factor (Kint et al., 1933) and further adapt to higher oxygen levels by forming spores (reviewed in (Dürre, 2014)), stating as an 'aeroprotection' strategy. It was further reported that *Salmonella typhimurium* may exploit ROS production for its own respiration. It has been shown that tetrathionate was formed in a ROS-dependent manner and that its respiration increases *Salmonella typhimurium* abundance in vivo (Winter et al., 2010).

Another aeroprotection strategy consists in bacteria extracellular colonisation on host tissues or within biofilms, thus avoiding oxygen diffusing within host organs. This strategy is used by various pathogenic enterobacteria such as *E. coli* (EPEC), Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), diffusely adherent *E. coli* (DAEC) or Enteroaggregative *E. coli* (EAEC). Their virulence requires their adherence to the host intestine epithelium, where microcolonies (e.g., EPEC) or biofilms (e.g., EAEC) are formed within the anaerobic luminal compartment, avoiding further oxygen exposure (reviewed in (Croxen et al., 2013)). A similar strategy is exploited by *Helicobacter pylori*, which remains mainly extracellular in a microaerophilic microenvironment, potentially within protective biofilms (Hathroubi, Servetas, Windham, Merrell, & Ottemann, 2018). It has been suggested that *Helicobacter pylori* may have an intracellular life (Dubois & Borén, 2007), although this point remains to be discussed.

Biofilm formation is another aeroprotection strategy used by pathogens. Oxygen diffusion within biofilms is limited, shaping an oxygen-deprived niche in the heart of the structure, while oxygen may diffuse in its periphery (Stewart et al., 2016). Biofilms are formed by several life-threatening pathogens, such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, pathogenic *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* or *Haemophilus influenzae*, among others (reviewed in (Jamal et al., 2018)) (Figure 2). Most of biofilm-forming bacteria are facultative anaerobes, which may evolve in this heterogeneous and complex microenvironment.

It is now well accepted that hypoxia is induced within host tissues during bacterial infection (infectious hypoxia). The invasion of host epithelial cells by bacteria stands as crucial early step of the infection process. The impact of bacteria invasion on host cell oxygenation status has been poorly investigated so far.

5 | INTRACELLULAR OXYGEN LEVEL DECREASES UPON BACTERIAL INFECTION

Oxygen availability plays a central role in host cell invasion by bacteria (reviewed in (Marteyn, Scorza, Sansonetti, & Tang, 2011)). Under anaerobic conditions, it has been shown that bacteria invasion efficiency was increased using *Shigella* (Marteyn et al., 2010) or *Salmonella* (Ernst et al., 1990) as facultative anaerobe models.

To better appreciate the importance of bacteria oxygen consumption, aerotolerance and anaerotolerance on their ability to survive within invaded host cells, the modulation of the intracellular oxygenation status remains to be minded. How the partial pressure of oxygen within infected cells evolves during infection remains elusive. The

development of innovative technologies, such as the FLIM combined with O₂ probes based on Pt-porphyrin (Sud, Zhong, Beer, & Mycek, 2005) (Papkovsky & Dmitriev, 2018) (Penjweini et al., 2020), is anticipated to provide these quantitative data. It has to be noticed that such experiments should be done under controlled low pO₂ to avoid experimental and non-physiological diffusion of atmospheric oxygen.

Nevertheless, there are indirect evidences that oxygen abundance varies in infected cells, which may have an important impact on the host cell function, metabolism or survival. Bacteria virulence mechanisms may be regulated by oxygen availability. Jones & Falkow have shown in *S. typhimurium* that *orgA* (encoding for the oxygen-regulated invasion protein OrgA) was over-expressed under low-oxygen conditions (Jones & Falkow, 1994). It has been demonstrated that *S. typhimurium* Δ *orgA* mutant is unable to invade and destroy M cells in Peyer's patches in vivo, indicating that OrgA is essential for host cells entry, although its precise function was not elucidated. *Shigella* Type III secretion system is not functional under anaerobic conditions (Marteyn et al., 2010) and has been reported to be inactive within infected cells (Nigro et al., 2019), strongly suggested that intracellular oxygen level is reduced upon *Shigella* infection and replication. In addition, it has been reported that the expression of several genes encoding for proteins involved in the adaptation of *Shigella* to changes in oxygen level such as *hemB* (porphobilinogen synthase) and *ppC* (phosphoenolpyruvate carboxylase) is overexpressed intracellularly (Bartoleschi et al., 2002).

Host cells' metabolic shifts occurring during bacterial invasion seem to indicate that a decrease of the intracellular oxygen level is induced during bacterial infection. Hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) is a well-characterized transcriptional regulator, which is stabilised in the absence of oxygen. It has been shown that upon *Clostridium difficile* infection of Caco-2 cells, a significant increase of HIF-1 α transcription and protein levels is observed (Hirota et al., 2010). Similar results were observed in Hep-2 cells infected by *Chlamydia pneumoniae*, at least during the early phase of infection (Rupp et al., 2007). However, it has to be noticed that HIF stabilisation does not necessarily reflect hypoxia induction during bacterial infection since it has been demonstrated that *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) alone induces HIF-1 α mRNA expression in monocytes (Frede, Stockmann, Freitag, & Fandrey, 2006) and in many other cell types. HIF degradation process is initiated by its hydroxylation catalysed by prolyl-hydroxylases (PHDs) in the presence of oxygen, ascorbate and 2-oxoglutarate. It has been demonstrated that various metabolic compounds such as succinate, fumarate and other molecules such as iron (FeIII), ROS or NO inhibit PHDs activity, leading to HIF stabilisation, even in the presence of oxygen (Selak et al., 2005) (Metzen, Zhou, Jelkmann, Fandrey, & Brüne, 2003) (Siegert et al., 2015).

Several studies report that host cell metabolism is regulated during bacterial infection, mainly through oxygen-independent glycolysis (reviewed in (Eisenreich, Rudel, Heesemann, & Goebel, 2019)). *Mycobacterium tuberculosis* induces such a metabolic shift in macrophages, repressing the oxidative phosphorylation and activating glycolysis (Gleeson et al., 2016) (Cumming, Addicott, Adamson, & Steyn, 2018). *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule 3-oxo-C12-HSL induces mitochondria dysfunction in bronchial epithelial cells (Maurice et al., 2019),

while *Chlamydia pneumoniae* infection increases monocyte glucose uptake (Rupp et al., 2007) and mitochondrial functions, favouring bacteria intracellular growth (Käding et al., 2017). It has been shown that under hypoxia, macrophage HIF-1 α was stabilised, and the TCA metabolites availability was reduced. In this context, it was reported that the intracellular replication of *Coxiella burnetii*, an aerobic obligate intracellular pathogen causing Q fever, was drastically repressed, although its viability was not impeded (Hayek et al., 2019). Hayek and colleagues demonstrated that *Coxiella burnetii* requires citrate under hypoxia, while its abundance is decreased in a HIF-1 α -dependent manner. Limiting citrate availability in macrophage infected by *Coxiella burnetii* stands as a novel defence mechanism to decrease its intracellular replication, although persistence is observed. Further investigations are required to define whether this metabolic adaptation occurs also under anoxia and to decipher how *Coxiella burnetii* use citrate as a carbon source and why it is essential for its proliferation under hypoxia.

6 | CONCLUDING REMARKS

In this review, we propose to better take into account bacteria oxygen consumption, aerotolerance and anaerotolerance to understand and characterize their ability to invade, survive and disseminate within host cells and tissues. Concomitantly, quantifying oxygen level within infected cells or infectious sites (in situ, with non-disruptive methods) will be the next challenge to confirm the importance of this question in vivo, requiring important technological developments to allow in situ pO₂ quantification using non-disruptive methods.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Ellen Arena and Jean-Yves Tinevez for their thoughtful comments and scientific discussions. This work was supported by the ANR JCJC grant (ANR-17-CE15-0012) and has benefitted from support provided by the Strasbourg Institute for Advanced Study (USIAS) for a Fellowship, within the French national programme 'Investment for the future' (IdEx-Unistra) (B.S.M.).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

No new data is generated

ORCID

Benoit S. Marteyn  <https://orcid.org/0000-0001-5638-702X>

REFERENCES

- Anand, A., Verma, P., Singh, A. K., Kaushik, S., Pandey, R., Shi, C., ... Gokhale, R. S. (2015). Polyketide quinones are alternate intermediate electron carriers during mycobacterial respiration in oxygen-deficient niches. *Molecular Cell*, 60, 637–650.
- Arai, H. (2011). Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 2, 103.
- Arena, E. T., Tinevez, J.-Y., Nigro, G., Sansonetti, P. J., & Marteyn, B. S. (2017). The infectious hypoxia: Occurrence and causes during *Shigella* infection. *Microbes and Infection*, 19, 157–165.

- Bartoleschi, C., Pardini, M. C., Scaringi, C., Martino, M. C., Pazzani, C., & Bernardini, M. L. (2002). Selection of *Shigella flexneri* candidate virulence genes specifically induced in bacteria resident in host cell cytoplasm. *Cellular Microbiology*, 4, 613–616.
- Berkley, J. A., Lowe, B. S., Mwangi, I., Williams, T., Bauni, E., Mwarumba, S., ... Scott, J. A. G. (2005). Bacteremia among children admitted to a rural hospital in Kenya. *The New England Journal of Medicine*, 352, 39–47.
- Borisov, V. B., Gennis, R. B., Hemp, J., & Verkhovsky, M. I. (2011). The cytochrome bd respiratory oxygen reductases. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807, 1398–1413.
- Bury-Moné, S., Kaakoush, N. O., Asencio, C., Mégraud, F., Thibonnier, M., Reuse, H. D., & Mendz, G. L. (2006). Is *Helicobacter pylori* a true microaerophile? *Helicobacter*, 11, 296–303.
- Choi, H.-J., Kim, S.-J., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J.-R., Storz, G., & Ryu, S.-E. (2001). Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell*, 105, 103–113.
- Cook, G. M., Greening, C., Hards, K., & Berney, M. (2014). Chapter one: Energetics of pathogenic bacteria and opportunities for drug development. *Advances in Microbial Physiology*, 65, 1–62.
- Cook, G. M., Hards, K., Vilchèze, C., Hartman, T., & Berney, M. (2014). Energetics of respiration and oxidative phosphorylation in *Mycobacteria*. *Microbiology Spectrum*, 2(3), 1–30. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0015-2013>.
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 822–880.
- Cumming, B. M., Addicott, K. W., Adamson, J. H., & Steyn, A. J. (2018). *Mycobacterium tuberculosis* induces decelerated bioenergetic metabolism in human macrophages. *eLife*, 7, e39169.
- Deudom, M., Koomey, M., & Moir, J. W. B. (2008). Roles of c-type cytochromes in respiration in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology*, 154, 2857–2864.
- Dubois, A., & Borén, T. (2007). *Helicobacter pylori* is invasive and it may be a facultative intracellular organism. *Cellular Microbiology*, 9, 1108–1116.
- Dürre, P. (2014). Physiology and sporulation in *Clostridium*. *Microbiology Spectrum*, 2, TBS-0010-2012.
- Eisenreich, W., Rudel, T., Heesemann, J., & Goebel, W. (2019). How viral and intracellular bacterial pathogens reprogram the metabolism of host cells to allow their intracellular replication. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 42.
- Ekici, S., Pawlik, G., Lohmeyer, E., Koch, H.-G., & Daldal, F. (2012). Biogenesis of cbb3-type cytochrome c oxidase in *Rhodobacter capsulatus*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817, 898–910.
- Ernst, R. K., Dombroski, D. M., & Merrick, J. M. (1990). Anaerobiosis, type 1 fimbriae, and growth phase are factors that affect invasion of HEp-2 cells by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*, 58, 2014–2016.
- Frede, S., Stockmann, C., Freitag, P., & Fandrey, J. (2006). Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF- κ B. *Biochemical Journal*, 396, 517–527.
- Gleeson, L. E., Sheedy, F. J., Palsson-McDermott, E. M., Triglia, D., O'Leary, S. M., O'Sullivan, M. P., ... Keane, J. (2016). Cutting edge: *Mycobacterium tuberculosis* induces aerobic glycolysis in human alveolar macrophages that is required for control of intracellular bacillary replication. *Journal of Immunology*, 196, 2444–2449.
- Hammer, N. D., Reniere, M. L., Cassat, J. E., Zhang, Y., Hirsch, A. O., Hood, M. I., & Skaar, E. P. (2013). Two heme-dependent terminal oxidases power *Staphylococcus aureus* organ-specific colonization of the vertebrate host. *MBio*, 4, e00241–e00213.
- Hathroubi, S., Servetas, S. L., Windham, I., Merrell, D. S., & Ottemann, K. M. (2018). *Helicobacter pylori* biofilm formation and its potential role in pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82, e00001-18.
- Hayek, I., Fischer, F., Schulze-Luehrmann, J., Dettmer, K., Sobotta, K., Schatz, V., ... Lüthmann, A. (2019). Limitation of TCA cycle intermediates represents an oxygen-independent nutritional antibacterial effector mechanism of macrophages. *Cell Reports*, 26, 3502–3510.e6.
- Hirai, T., Osamura, T., Ishii, M., & Arai, H. (2016). Expression of multiple cbb3 cytochrome c oxidase isoforms by combinations of multiple iso-subunits in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 12815–12819.
- Hirota, S. A., Fines, K., Ng, J., Traboulsi, D., Lee, J., Ihara, E., ... Beck, P. L. (2010). Hypoxia-inducible factor signaling provides protection in *Clostridium difficile*-induced intestinal injury. *Gastroenterology*, 139, 259–269.e3.
- Hopper, A., Tovell, N., & Cole, J. (2009). A physiologically significant role in nitrite reduction of the CcoP subunit of the cytochrome oxidase cbb3 from *Neisseria gonorrhoeae*. *FEMS Microbiology Letters*, 301, 232–240.
- Hutfless, E. H., Chaudhari, S. S., & Thomas, V. C. (2018). Emerging roles of nitric oxide synthase in bacterial physiology. *Advances in Microbial Physiology*, 72, 147–191.
- Jackson, R. J., Elvers, K. T., Lee, L. J., Gidley, M. D., Wainwright, L. M., Lightfoot, J., ... Poole, R. K. (2007). Oxygen reactivity of both respiratory oxidases in *Campylobacter jejuni*: The cydAB genes encode a cyanide-resistant, low-affinity oxidase that is not of the cytochrome bd type. *Journal of Bacteriology*, 189, 1604–1615.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., ... Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81, 7–11.
- Jennewein, J., Matuszak, J., Walter, S., Felmy, B., Gendera, K., Schatz, V., ... Jantsch, J. (2015). Low-oxygen tensions found in *Salmonella*-infected gut tissue boost *Salmonella* replication in macrophages by impairing antimicrobial activity and augmenting *Salmonella* virulence. *Cellular Microbiology*, 17, 1833–1847.
- Jo, J., Cortez, K. L., Cornell, W. C., Price-Whelan, A., & Dietrich, L. E. (2017). An orphan cbb3-type cytochrome oxidase subunit supports *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth and virulence. *eLife*, 6, e30205.
- Jones, B. D., & Falkow, S. (1994). Identification and characterization of a *Salmonella typhimurium* oxygen-regulated gene required for bacterial internalization. *Infection and Immunity*, 62, 3745–3752.
- Jones, S. A., Chowdhury, F. Z., Fabich, A. J., Anderson, A., Schreiner, D. M., House, A. L., ... Conway, T. (2007). Respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Infection and Immunity*, 75, 4891–4899.
- Jünemann, S. (1997). Cytochrome bd terminal oxidase1All amino acid numbering refers to the *E. coli* enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1(321), 107–127.
- Käding, N., Kaufhold, I., Müller, C., Szaszák, M., Shima, K., Weinmaier, T., ... Rupp, J. (2017). Growth of *Chlamydia pneumoniae* is enhanced in cells with impaired mitochondrial function. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 499.
- Khademian, M., & Imlay, J. A. (2021). How microbes evolved to tolerate oxygen. *Trends in Microbiology*, 29(5), 428–440.
- Kint, N., Janoir, C., Monot, M., Hoys, S., Soutourina, O., Dupuy, B., & Martin-Verstraete, I. (1933). The alternative sigma factor σ B plays a crucial role in adaptive strategies of *Clostridium difficile* during gut infection. *Environmental Microbiology*, 19, 1933–1958.
- Klebanoff, S. J., Kettle, A. J., Rosen, H., Winterbourn, C. C., & Nauseef, W. M. (2013). Myeloperoxidase: A front-line defender against phagocytosed microorganisms. *Journal of Leukocyte Biology*, 93, 185–198.
- Klinkenberg, L. G., Sutherland, L. A., Bishai, W. R., & Karakousis, P. C. (2008). Metronidazole lacks activity against *Mycobacterium tuberculosis* in an in vivo hypoxic granuloma model of latency. *The Journal of Infectious Diseases*, 198, 275–283.
- Kracke, F., Vassilev, I., & Krömer, J. O. (2015). Microbial electron transport and energy conservation—The foundation for optimizing bioelectrochemical systems. *Frontiers in Microbiology*, 6, 575.
- Krieg, N. R., & Hoffman, P. S. (1986). Microaerophily and oxygen toxicity. *Annual Review of Microbiology*, 40, 107–130.
- Light, S. H., Su, L., Rivera-Lugo, R., Cornejo, J. A., Louie, A., Iavarone, A. T., ... Portnoy, D. A. (2018). A flavin-based extracellular electron transfer mechanism in diverse Gram-positive bacteria. *Nature*, 562, 140–144.

- Lone, A. G., Atci, E., Renslow, R., Beyenal, H., Noh, S., Fransson, B., ... Call, D. R. (2015a). Colonization of epidermal tissue by *Staphylococcus aureus* produces localized hypoxia and stimulates secretion of antioxidant and caspase-14 proteins. *Infection and Immunity*, *83*, 3026–3034.
- Lone, A. G., Atci, E., Renslow, R., Beyenal, H., Noh, S., Fransson, B., ... Call, D. R. (2015b). *Staphylococcus aureus* induces hypoxia and cellular damage in porcine dermal explants. *Infection and Immunity*, *83*, 2531–2541.
- Marteyn, B., Scorza, F. B., Sansonetti, P. J., & Tang, C. (2011). Breathing life into pathogens: the influence of oxygen on bacterial virulence and host responses in the gastrointestinal tract. *Cellular Microbiology*, *13*, 171–176.
- Marteyn, B., West, N. P., Browning, D. F., Cole, J. A., Shaw, J. G., Palm, F., ... Tang, C. M. (2010). Modulation of *Shigella* virulence in response to available oxygen in vivo. *Nature*, *465*, 355–358.
- Maurice, N. M., Bedi, B., Yuan, Z., Goldberg, J. B., Koval, M., Hart, C. M., & Sadikot, R. T. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* induced host epithelial cell mitochondrial dysfunction. *Scientific Reports*, *9*, 11929.
- Melican, K., Boekel, J., Månsson, L. E., Sandoval, R. M., Tanner, G. A., Källskog, O., ... Richter-Dahlfors, A. (2008). Bacterial infection-mediated mucosal signalling induces local renal ischaemia as a defence against sepsis. *Cell Microbiol*, *10*, 1987–1998.
- Melo, A. M. P., & Teixeira, M. (2016). Supramolecular organization of bacterial aerobic respiratory chains: From cells and back. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1857*, 190–197.
- Metzen, E., Zhou, J., Jelkmann, W., Fandrey, J., & Brüne, B. (2003). Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1 α by inhibition of prolyl hydroxylases. *Molecular Biology of the Cell*, *14*, 3470–3481.
- Nagata, K., Tsukita, S., Tamura, T., & Sone, N. (1996). A db-type cytochrome-c oxidase terminates the respiratory chain in *Helicobacter pylori*. *Microbiology*, *142*, 1757–1763.
- Nigro, G., Arena, E. T., Sachse, M., Moya-Nilges, M., Marteyn, B. S., Sansonetti, P. J., & Campbell-Valois, F.-X. (2019). Mapping of *Shigella flexneri*'s tissue distribution and type III secretion apparatus activity during infection of the large intestine of Guinea pigs. *Pathogens and Disease*, *77*, 1–9.
- Papkovsky, D. B., & Dmitriev, R. I. (2018). Imaging of oxygen and hypoxia in cell and tissue samples. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*, 2963–2980.
- Penjweini, R., Roarke, B., Alspaugh, G., Gevorgyan, A., Andreoni, A., Pasut, A., ... Knutson, J. R. (2020). Single cell-based fluorescence lifetime imaging of intracellular oxygenation and metabolism. *Redox Biology*, *34*, 101549.
- Pereira, M. M., Santana, M., & Teixeira, M. (2001). A novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1505*, 185–208.
- Peterson, E. J. R., Abidi, A. A., Arrieta-Ortiz, M. L., Aguilar, B., Yurkovich, J. T., Kaur, A., ... Baliga, N. S. (2020). Intricate genetic programs controlling dormancy in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Reports*, *31*, 107577.
- Rupp, J., Gieffers, J., Klinger, M., Zandbergen, G. V., Wrase, R., Maass, M., ... Hellwig-Burgel, T. (2007). *Chlamydia pneumoniae* directly interferes with HIF-1 α stabilization in human host cells. *Cellular Microbiology*, *9*, 2181–2191.
- Rustad, T. R., Sherrid, A. M., Minch, K. J., & Sherman, D. R. (2009). Hypoxia: A window into *Mycobacterium tuberculosis* latency. *Cellular Microbiology*, *11*, 1151–1159.
- Selak, M. A., Armour, S. M., MacKenzie, E. D., Boulahbel, H., Watson, D. G., Mansfield, K. D., ... Gottlieb, E. (2005). Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*, *7*, 77–85.
- Siegert, I., Schödel, J., Nairz, M., Schatz, V., Dettmer, K., Dick, C., ... Jantsch, J. (2015). Ferritin-mediated iron sequestration stabilizes hypoxia-inducible factor-1 α upon LPS activation in the presence of ample oxygen. *Cell Reports*, *13*, 2048–2055.
- Singh, B., Ghosh, J., Islam, N. M., Dasgupta, S., & Kirsebom, L. A. (2010). Growth, cell division and sporulation in Mycobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, *98*, 165–177.
- Smith, M. A., Finel, M., Korolik, V., & Mendz, G. L. (2000). Characteristics of the aerobic respiratory chains of the microaerophiles *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *Archives of Microbiology*, *174*, 1–10.
- Sousa, F. L., Alves, R. J., Ribeiro, M. A., Pereira-Leal, J. B., Teixeira, M., & Pereira, M. M. (2012). The superfamily of heme-copper oxygen reductases: Types and evolutionary considerations. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1817*, 629–637.
- Stewart, P. S., Zhang, T., Xu, R., Pitts, B., Walters, M. C., Roe, F., ... Moter, A. (2016). Reaction-diffusion theory explains hypoxia and heterogeneous growth within microbial biofilms associated with chronic infections. *npj Biofilms and Microbiomes*, *2*, 16012.
- Sud, D., Zhong, W., Beer, D., and Mycek, M.-A. (2005) Measurement of intracellular oxygen levels using fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). 585907.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., ... Magrini, N. (2017). Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, *18*, 318–327.
- Tinevez, J.-Y., Arena, E. T., Anderson, M., Nigro, G., Injarabian, L., André, A., ... Marteyn, B. S. (2019). *Shigella*-mediated oxygen depletion is essential for intestinal mucosa colonization. *Nature Microbiology*, *4*, 2001–2009.
- Tsai, M. C., Chakravarty, S., Zhu, G., Xu, J., Tanaka, K., Koch, C., ... Chan, J. (2006). Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: Cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cellular Microbiology*, *8*, 218–232.
- Uden, G., & Trageser, M. (1991). Oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*: Control of anaerobic respiration by the FNR protein. *Antonie van Leeuwenhoek*, *59*, 65–76.
- VanOrsdel, C. E., Bhatt, S., Allen, R. J., Brenner, E. P., Hobson, J. J., Jamil, A., ... Hemm, M. R. (2013). The *Escherichia coli* CydX protein is a member of the CydAB cytochrome bd oxidase complex and is required for cytochrome bd oxidase activity. *Journal of Bacteriology*, *195*, 3640–3650.
- Wei, Q., Minh, P. N. L., Dötsch, A., Hildebrand, F., Panmanee, W., Elfarash, A., ... Cornelis, P. (2012). Global regulation of gene expression by OxyR in an important human opportunistic pathogen. *Nucleic Acids Research*, *40*, 4320–4333.
- Winstedt, L., Frankenberg, L., Hederstedt, L., & von Wachenfeldt, C. (2000). *Enterococcus faecalis* V583 contains a cytochrome bd-type respiratory oxidase. *Journal of Bacteriology*, *182*, 3863–3866.
- Winter, S. E., Thiennimitr, P., Winter, M. G., Butler, B. P., Huseby, D. L., Crawford, R. W., ... Bäuml, A. J. (2010). Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature*, *467*, 426–429.
- Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K. C., ... Döring, G. (2002). Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *The Journal of Clinical Investigation*, *109*, 317–325.
- Yamanaka, T., Fukumori, Y., Yamazaki, T., Kato, H., & Nakayama, K. (1985). A comparative survey of several bacterial aa3-type cytochrome c oxidases. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *23*, 273–277.

How to cite this article: André AC, Debande L, Marteyn BS.

The selective advantage of facultative anaerobes relies on their unique ability to cope with changing oxygen levels during infection. *Cellular Microbiology*. 2021;e13338. <https://doi.org/10.1111/cmi.13338>

Article 2 : *Escherichia coli* killing by epidemiologically successful sublineages of *Shigella sonnei* is mediated by colicins

(Publiée dans le journal *eBioMedicine* en Octobre 2023)

Introduction

S. sonnei est la souche de *Shigella* responsable de 24% des cas de shigellose chaque année, notamment, dans les pays développés. Cette souche est transmise principalement chez les voyageurs et les hommes ayant des relations sexuelles avec les hommes. La prévalence de cette souche augmente chaque année pour une raison qui reste inconnue, et la multirésistance aux antibiotiques de *S. sonnei* devient alarmante. Il est nécessaire d'exploiter davantage les études génétiques et épidémiologiques des souches afin de comprendre pourquoi certaines *S. sonnei* sont plus prévalentes que d'autres.

En tant qu'entéropathogène, *S. sonnei* est constamment en compétition avec les bactéries du microbiote qui constitue une barrière de protection à la surface de l'épithélium intestinal du côlon. Les mécanismes de compétition interbactériens sont importants pour *S. sonnei*, qui, doit éliminer les autres bactériens pour réussir à envahir la barrière épithéliale. Le T6SS de cette bactérie pourrait jouer un rôle dans cette compétition tout comme les colicines, qui sont des toxines sécrétées par la bactérie, pénétrant dans les cellules cibles et pouvant potentiellement être essentielles à la compétition interbactérienne.

Dans cette étude, pour laquelle j'ai apporté mon expertise technique de purification et d'analyse de surnageant de *S. sonnei*, nous avons étudié la compétition entre *E. coli* et des souches cliniques de *S. sonnei* isolées et séquencées provenant d'une étude clinique au Royaume-Uni menée entre 2008 et 2014. Nous avons testé des sous lignées épidémiologiques par une méthode de phénotypage en bloc de répliques épidémiologiques (BPER - *Bulk Phenotyping of Epidemiological Replicates*) couplées à des études génomiques (bGWAS - *bacterial Genome Wide Association Studies*) et mis en évidence que la destruction d'*E. coli* par *S. sonnei* est médiée par les colicines dans les sous-lignées épidémiologiques performantes. L'implication du T6SS dans la compétition interbactérienne a également été écartée dans notre étude du fait de l'absence de certains gènes essentiels au fonctionnement du T6SS dans nos sous-lignées épidémiologiquement efficaces.

Escherichia coli killing by epidemiologically successful sublineages of *Shigella sonnei* is mediated by colicins

P. Malaka De Silva,^{a,h} Rebecca J. Bennett,^{a,h} Lauriane Kuhn,^b Patryk Ngondo,^c Lorine Debande,^c Elisabeth Njamkepo,^d Brian Ho,^e François-Xavier Weill,^d Benoît S. Marteyn,^c Claire Jenkins,^f and Kate S. Baker^{a,g,*}



^aDepartment of Clinical Infection, Microbiology, and Immunology, Institute for Infection, Veterinary, and Ecological Sciences (IVES), University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom

^bPlateforme protéomique Strasbourg Esplanade FR1589 du CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

^cUniversité de Strasbourg, CNRS, Architecture et Réactivité de l'ARN, UPR9002, F-67000, Strasbourg, France

^dInstitut Pasteur, Université Paris Cité, Unité des Bactéries pathogènes entériques, Centre National de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella*, Paris, F-75015, France

^eInstitute of Structural and Molecular Biology, University College London and Birkbeck, London, UK

^fGastro and Food Safety (One Health) Division, UK Health Security Agency, Colindale, London, UK

^gDepartment of Genetics, University of Cambridge, Downing Place, Cambridge, UK

Summary

Background *Shigella* sp. are enteric pathogens which causes >125 million cases of shigellosis annually. *S. sonnei* accounts for about a quarter of those cases and is increasingly prevalent in industrialising nations. Being an enteric pathogen, *S. sonnei* benefits from outcompeting gut commensals such as *Escherichia coli* to establish itself and cause disease. There are numerous mechanisms that bacterial pathogens use to outcompete its rivals including molecules called colicins. A Type 6 Secretion System (T6SS) was recently described as contributing to *E. coli* killing in *S. sonnei*.

Methods We used Bulk Phenotyping of Epidemiological Replicates (BPER) which combined bacterial Genome Wide Association Studies (bGWAS) and high throughput phenotyping on a collection of *S. sonnei* surveillance isolates to identify the genetic features associated with *E. coli* killing and explore their relationship with epidemiological behaviour. We further explored the presence of colicins and T6SS components in the isolates using genomics, laboratory experimentation, and proteomics.

Findings Our bGWAS analysis returned known and novel colicin and colicin related genes as significantly associated with *E. coli* killing. *In silico* analyses identified key colicin clusters responsible for the killing phenotype associated with epidemiologically successful sub-lineages. The killing phenotype was not associated with the presence of a T6SS. Laboratory analyses confirmed the presence of the key colicin clusters and that killing was contact-independent.

Interpretation Colicins are responsible for *E. coli* killing by *S. sonnei*, not a T6SS. This phenotype contributes to shaping the observed epidemiology of *S. sonnei* and may contribute to its increasing prevalence globally. BPER is an epidemiologically relevant approach to phenotypic testing that enables the rapid identification of genetic drivers of phenotypic changes, and assessment of their relevance to epidemiology in natural settings.

Funding Biotechnology and Biological Sciences Research Council, Biotechnology and Biological Sciences Research Council Doctoral Training Partnership studentship, Wellcome Trust, Medical Research Council (UK), French National Research Agency.

Copyright © 2023 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: Shigella; Colicins; Interbacterial competition; T6SS

Introduction

Shigella sp. cause >125 million cases of shigellosis that result in ~212,000 deaths annually and understanding

the biological drivers of its success as a pathogen is critical to public health.^{1,2} *S. sonnei* accounts for 24% of cases of shigellosis worldwide and contributes

*Corresponding author. Department of Clinical Infection, Microbiology, and Immunology, Institute for Infection, Veterinary, and Ecological Sciences (IVES), University of Liverpool, Liverpool, UK.

E-mail address: kb827@cam.ac.uk (K.S. Baker).

^hAuthors contributed equally.

eBioMedicine
2023;97: 104822
Published Online xxx
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104822>

Research in context**Evidence before this study**

Shigella sonnei causes the acute diarrhoeal disease shigellosis and is increasing globally in prevalence for reasons which are not fully understood. As there is competition among inhabitants of the human gut for establishment, mechanisms for interbacterial competition are crucial for survival, however their role in an epidemiological context is poorly characterised. Colicins are a known mechanism of interbacterial competition among Enterobacteriaceae and have also been described in *Shigella* sp. An alternative competition mechanism, a Type 6 Secretion System was also recently described in an *S. sonnei* organism and was suggested to contribute to its epidemiological success. Identifying key determinants of interbacterial competition in, and their relationship with the epidemiology of, globally important diarrhoeal pathogens is thus a significant knowledge gap that requires innovative approaches.

Added value of this study

Our study identified the genetic determinants of *E. coli* killing in an unbiased way (bacterial Genome Wide Association Studies) and revealed multiple known and novel colicin and

colicin-related genes. Contrastingly we found no association of the phenotype with T6SS configuration. We further identify the key colicin clusters that are responsible for killing in *S. sonnei* among an epidemiologically characterised collection of surveillance isolates. We show that epidemiologically successful sub-lineages contained colicins which were expressed extracellularly and mediated contact independent killing.

Implications of all the available evidence

Our study demonstrates the importance of colicins in mediating epidemiologically relevant interbacterial competition in *S. sonnei* and refutes the importance of a T6SS in this system. We have further identified several novel apparently colicin-related genes for further functional investigation. More broadly, our study framework of using 'epidemiological replicates' represents a move away from model organism approaches where combined high throughput phenotyping, genomic, and laboratory, analyses can rapidly identify genetic determinants of high epidemiological relevance in bacterial populations.

proportionately more to the disease burden in industrialising and high-income countries (HICs) where it is primarily transmitted through travel and among certain risk groups e.g., men who have sex with men (MSM).³⁻⁵ Recent genomic epidemiology studies of *S. sonnei* have revealed a concerning emergence of highly, and extensively drug resistant strains⁶⁻¹³ leading to it being designated a WHO priority organism for AMR.¹⁴ While global subtyping systems can help us trace the shifting population dynamics, there is a need to further leverage these genomic epidemiology studies to better understand the biology of the organism and identify what drives certain sublineages to success.¹⁵

An example relevant to this study is the existence of four co-circulating subclades of MSM-associated *S. sonnei* in the UK during 2008–2014, three of which endured in time and spread internationally, and one of which did not [16 and see further details below]. Being an enteric pathogen, *S. sonnei* is in constant competition with the other members of the gut microbiota which acts as the barrier to successful infection and invasion of the gut epithelial cells in the colon.¹⁷ Interbacterial competition mechanisms are thought to be important for a multitude of bacterial pathogens such as *Burkholderia cepacia*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Salmonella* spp.¹⁸⁻²² Therefore, mechanisms that are advantageous for interbacterial competition are likely to be beneficial for *S. sonnei*.

There is a plethora of interbacterial competitions mechanisms described, including colicins and Type VI secretion systems (T6SSs); the latter of which was

recently described in *S. sonnei*.^{23,24} T6SSs are specialised secretion systems found in Gram negative bacteria capable of delivering a wide variety of effectors (usually antibacterial proteins) directly into the target cells.^{25,26} T6SSs function via a contractile sheath that propels a needle-like structure containing the spike complex with the effector protein into the adjacent target cell in a contact-dependent manner.²⁷ In contrast to T6SS, colicins are not contact-dependent as they are secreted into the surrounding environment and translocated through the outer membrane of target cells by parasitising the existing protein translocation systems that perform other important biological functions in the sensitive cells.²⁸ These toxic proteins are produced by many enteric bacteria and are usually encoded on a plasmid alongside the colicin lysis protein that is responsible for colicin release and the immunity protein that protects the host from its own colicins.^{29,30} Colicins have been studied extensively for more than three decades as a major component of inter-bacterial warfare with varying modes of action.³¹⁻³³ Being a contact-independent process, production, and secretion of colicins with respect to complex bacterial spatial structures has been a focus of study in the recent years and how it depends on sensing and responding to the surroundings.^{34,35} While the importance of colicins for interbacterial competition/persistence have been shown *in vivo* with reports of colicins promoting diversity of the gut microbiota,³⁶⁻³⁸ the impact of colicins on bacterial population structures in real world settings remain poorly explored.

Here we sought to identify the mechanisms in *S. sonnei* responsible for interbacterial competition with a relevant microbiota competitor, *Escherichia coli*, and relate this to established epidemiological understandings. To do so, we leveraged a collection of sequenced isolates from a previous cross-sectional genomic epidemiology study of national surveillance in the United Kingdom from 2008 to 2014.¹⁶ As we were interested in comparing the behaviour of epidemiological sublineages, we conducted our experimental replicates at an epidemiologically relevant level (i.e., testing many clinical isolates from each sublineage rather than testing fewer representatives multiple times) in an experimental framework we call Bulk Phenotyping of Epidemiological Replicates (BPER). We advocate BPER as a concept for moving on from extrapolating from model organisms in the genomic era while also overcoming some of the complications of using poorly characterised clinical isolates for laboratory studies. By coupling BPER to bacterial Genome Wide Association Studies (bGWAS), we demonstrate that *E. coli* killing in *S. sonnei* is mediated by colicins found in epidemiologically successful sublineages.

Methods

Strains, their whole genome sequences, and phylogenetic tree construction

The main collection of *S. sonnei* genomes (n = 164 isolates, Table 1) used in this study originated from the archive of isolates from the national reference laboratory of UK Health Security Agency collected from 2008 to 2014 and has been described before.¹⁶ Sequencing data for all isolates is deposited in the European Nucleotide Archive and individual accession numbers are provided in Supplementary Table S1. An additional isolate, CIP 106374, which was also previously described was included in the bioinformatic analyses and sequenced as mentioned in Supplementary appendix along with the full details of phylogenetic tree construction and genotyping.

In addition to *S. sonnei*, several *E. coli* strains were used in this study including the laboratory strain MG1655, and three diverse isolates received at the National Reference Laboratory during 2023: including a commensal ST10 (O15:H16), an ST6199 (O1:H7), and a pathogenic ST131 (O25:H4) (Table 2).

Growth conditions for bacterial strains

All bacterial strains were grown in tryptone soy broth (TSB) (Millipore Sigma, UK) at 37 °C in a shaking incubator (220 rpm) unless otherwise stated. Antibiotic selection where applicable was carried out using kanamycin or azithromycin both at 30 µg/ml.

Initial screen of subclade representatives for killing

Overnight pre-cultures of both *S. sonnei* and *E. coli* were diluted 1:100 (v/v) in fresh TSB and grown to mid-log phase. 10 µl of competition mixture containing *E. coli*: *S. sonnei* (1:10) was spotted onto a nitrocellulose membrane on a tryptone soy agar plate and incubated overnight at 37 °C. Competition mixture was then washed off into 500 µl of sterile PBS, serially diluted and plated on selective media for CFU enumeration.

BPER using cell sorter

Culturable *S. sonnei* isolates corresponding to genomes (n = 159) were grown overnight in 96 well flat bottom plates (Greiner Bio One, UK) containing 150 µl of TSB and diluted 1:100 (v/v) into fresh TSB and grown for 2 h. *E. coli* was grown and diluted into fresh media as was done for initial killing assays and 880 µl of mid-log phase culture was diluted in 52 ml of TSB and 130 µl of that was distributed into each well of the 96-well plate. 20 µl of the mid-log phase *S. sonnei* cultures were then added to each well to make up a final volume of 150 µl with 1:10 (*E. coli*: *S. sonnei*) of the competition mixture and incubated overnight. The overnight competition mixtures were then diluted and GFP expressing *E. coli* cells which had survived the competition with *S. sonnei* were counted using a Bio-Rad ZE5 Cell Analyzer in a

Genotype	Isolates (N)	Name	Original name	Epidemiological summary	Reference
3.6.1	10	CipR_parent	-	Subclade from which ciprofloxacin-resistant sublineage emerged	15
3.6.1.1	16	CipR	Ciprofloxacin-resistant Pop2	Triple QRDR ^a mutation ciprofloxacin-resistant sublineage	39,40
3.6.1.1.3	4	-	-	Ciprofloxacin-resistant	39,41
3.6.1.1.3.1	7	CipR MSM1	MSM Clade 1	MSM-linked ciprofloxacin resistant isolates	41
3.6.2	9	Central Asia III Subclade	-	Associated with areas in Central Asia	41,42
3.6.3	9	Central Asia III Subclade	-	Associated with areas in Central Asia	39,41
3.7.16	7	Global III Subclade	-	-	43
3.7.18	19	Global III Subclade	MSM Clade 3	MSM-associated	44
3.7.25	46	MSM4	MSM Clade 4	MSM-associated	41
3.7.29.1.2	7	VN2 MSM2	MSM Clade 2	MSM-associated. Emerging from sweep 2 of Vietnam clone	7,45
3.7.30.4.1	6	OJC	OJC-associated	Associated with the Orthodox Jewish communities in Israel, UK, USA and Europe	42

^aQRDR = quinolone resistance determining region. ^bFor brevity, only genotypes that included >4% of isolates are included in the table. Full genotyping data is available in Supplementary Table S1.

Table 1: Population structure summary of *S. sonnei* genotypes (n = 164) in this study.^b

Strains	Isolates (N)	Description	Reference
<i>S. sonnei</i> ^a	159	Cross-sectional isolates from routine surveillance during 2008–2014 collected by Public Health England (now UKHSA).	¹⁶
<i>S. sonnei</i> CIP 106347	1	<i>S. sonnei</i> clinical isolate from the collection at Institut Pasteur, previously described as having a functional T6SS	²⁴
<i>E. coli</i> MG1655	1	<i>E. coli</i> MG1655 strain with a chromosomally encoded, constitutively expressed GFP marker and a kanamycin resistance marker	Previously used in ⁴⁶
<i>E. coli</i> LAES2471692004	1	Clinical isolate of <i>E. coli</i> belonging to ST6199 (O1:H7) received at the National Reference Laboratory	This study
<i>E. coli</i> LAE3140732004	1	Clinical isolate of <i>E. coli</i> belonging to ST131 (O25:H4) received at the National Reference Laboratory	This study
<i>E. coli</i> LAE31441672004	1	Clinical isolate of <i>E. coli</i> belonging to ST10 (O15:H16) received at the National Reference Laboratory	This study

^aVarious—see [Supplementary Table S1](#) n = 159 as five isolates (compared with [Table 1](#)) failed to grow.

Table 2: Summary of bacterial isolates (n = 163) used in this study and their origins.

total of 10,000 events per well. The percentage of GFP expressing cells were calculated using FCS Express version 7 (De Novo Software) and plotted onto the phylogenetic tree using iTOL.⁴⁷

BPER growth assays using plate reader

Competition mixtures were set up similar to the cell sorter method albeit in a black 96 well plate (Greiner Bio One, UK). Fluorescence signal from the *E. coli* in the completion was measured every 15 min using a Synergy H1 multi-mode plate reader (BioTek Instruments) and a clear GFP signal corresponding to the optical density—based growth curve for *E. coli* was considered *E. coli* survival and used as a binary phenotype for *E. coli* killing.

Genome wide association study

Draft assemblies of all isolates were assembled using Unicycler v0.4.8⁴⁸ and annotated using Prokka v1.14.6.⁴⁹ To generate the input for the GWAS kmer analysis, kmers were counted from assemblies using fsm-lite v1.0. Lastly, to generate the input file for the GWAS COG analysis, Roary v1.007002 was utilised to generate a gene presence/absence Rtab file containing the presence or absence of each gene in each isolate.⁵⁰

After generation of appropriate inputs, GWAS was carried out using Pyseer v1.3.6.⁵¹ Pyseer uses linear models with fixed or mixed effects to estimate the effect of genetic variation in a bacterial population on a phenotype of interest, while accounting for potential confounding by population structure. For this investigation, presence or absence of the *E. coli* killing phenotype was utilised as the categorical phenotype ([Supplementary Table S1](#)). To account for population structure, all analyses were supplemented with phylogenetic distances from the mid-point rooted core genome phylogeny (above). Pyseer analyses were run using the linear mixed model (LMM). Specifically, the COG analyses were run using the gene presence absence file generated from Roary and the phylogenetic distances from the mid-point rooted core genome phylogeny. The default filters of Pyseer were utilised to filter out very low frequency COGs. Further GWAS investigations were carried out using Scoary v1.6.16⁵²

utilising the gene presence/absence.csv file generated via the Roary pangenome pipeline as well as a trait file consisting of the *E. coli* killing phenotype for each sample.

Colicin database construction and detection

To investigate the presence or absence of specific colicins within the isolates, a large quantity of colicin sequences were collated. Over 10,000 colicins from over 50 species of bacteria were collated from the European Nucleotide Archive as well as including some isolates from previously published sources.⁵³ A multi-FASTA file containing the collated colicin sequences was utilised to generate a custom database via the prepareref command of ARIBA v2.14.6 where prepareref removes erroneous data and runs cd-hit to cluster the sequences based on a user-defined similarity threshold (90% in our case). ARIBA v2.14.6 was then run with the FASTQ files of all isolates, a percentage sequence ID cut-off of 95% and the colicin database to report which sequences were observed in each isolate. The *E. coli* isolates were screened for the colicins and colicin related genes using ABRicate v1.0.1 (<https://github.com/tseemann/abricate>) under the default settings using our custom colicin database. The database of colicin sequences are publicly available through figshare (10.6084/m9.figshare.20768260.v1).

Statistical testing

All statistical analyses were performed using R v3.6.1. To determine the significant difference between the T6SS profiles of the killing versus the non-killing isolates, an independent t-test was undertaken comparing the number of T6SS elements in each group (i.e., killing and non-killing). Further independent t-test were undertaken to determine the association of the killing phenotype with each detected colicin cluster to determine their order of iterative addition as 'key colicin clusters' (see Results).

Exploring the presence of the T6SS

The 18 components of the full T6SS were extracted from the annotated Nanopore sequence of *S. sonnei* CIP 106347 and compiled into a singular multi-FASTA file.

SRST2 v0.2.0⁵⁴ was then utilised for the purpose of T6SS component gene detection as a custom database. The T6SS components within the multi-FASTA were not pre-clustered and therefore were assigned to gene clusters based on 90% nucleotide similarity via CD-HIT v4.8.1.⁵⁵ Python scripts provided as part of the SRST2 package were utilised to parse the clusters and generate a SRST2 compatible database. SRST2 gene detection was then run utilising the custom T6SS database.

Role of funders

Funders did not have any role in study design, data collection, data analyses, interpretation, or writing of report.

Results

The epidemiology and global context of the isolate collection

A collection of *S. sonnei* genomes used in this study came from a cross sectional subsample of routine microbiological surveillance in the United Kingdom from between 2008 and 2014 (n = 164).¹⁶ The original epidemiological study revealed the presence of four distinct clades which were co-circulating among MSM. In this study, Clades 1, 2, and 4 showed markers of population level epidemiological success (specifically international spread and prolonged circulation) relative to Clade 3, which was not successful.¹⁶ Notably, a recently described international global genotyping framework has renamed these Clades 1–4 (above) as Subclades 3.6.1.1.3.1 (CipR.MSM1), 3.7.29.1.2 (VN2.MSM2), 3.7.18, and 3.7.25 (MSM4) respectively.¹⁵ These isolates were utilised along with CIP 106347, which was previously used in studies of a putative *S. sonnei* T6SS²⁴ to construct a detailed phylogeny complemented with genotype assignments (Fig. 1).

All *S. sonnei* belonged to the globally disseminated multidrug resistant lineage of *S. sonnei*, Lineage 3 (Table 1, Fig. 1). Further genotyping showed that most isolates (61%, n = 101) belonged to Clade 3.7, particularly Subclade 3.7.25 (MSM4, 28%, n = 46) and Subclade 3.7.18 (12%, n = 19) (Table 1). The remaining isolates (39%, n = 64) belonged to Subclade 3.4.1 (Latin American III) and various Subclades of Clade 3.6 (Central Asia III) including 3.6.1 (CipR_parent), 3.6.1.1 (CipR), 3.6.1.1.3, 3.6.1.1.3.1 (CipR MSM1), 3.6.2, and 3.6.3 (Table 1). Correlating the genotype names with epidemiological history revealed that various globally important subclades of *S. sonnei* were captured in our dataset including internationally disseminating antimicrobial resistant genotypes (Table 1 and Supplementary Table S1). Thus, our collection contained a breadth of the diversity of the globally disseminated Lineage 3.

E. coli killing is common and associated with genotype in *S. sonnei*

After an initial low throughput screen revealed differences in the *E. coli* killing phenotype among Subclade

representatives (Supplementary Figure S1), we scaled our approach to include the entire collection of *S. sonnei*. We did this so our laboratory assays were being replicated at our desired level of inference i.e., we wanted to relate the phenotype to the epidemiological behaviour of different genomic subtypes, so we needed multiple clinical isolates that belonged to those subtypes, rather than biological or technical replicates (though for robustness we also included duplicate technical replicates), which we call BPER.

Owing to the number of isolates involved and our ambition to scale the BPER approach further in future studies, we assayed the killing phenotype in a high-throughput manner. Specifically, we used cell sorting to measure the proportion (%) of green-fluorescent *E. coli* remaining after overnight competition with *S. sonnei* in a 96-well format. As a cell sorter is a specialist equipment, we also correlated these results with a binary read out of green fluorescence following a simple plate-reader based growth assay which is more broadly available. Introducing a threshold of positivity (20%) among the cell sorting results of these assays led to 99% concordance between the two approaches (Fig. 1, Supplementary Table S1, see methods). We found that most 82% (131/159) of *S. sonnei* displayed *E. coli* killing and that phenotype clustered with genotype (Fig. 1). The continuous data (from cell sorting) revealed a spectrum of difference in the phenotype with the proportion of *E. coli* following competition being between 0% and 89% (mean = 14%). Associating the phenotype against the population structure of *S. sonnei* revealed that Subclades of the Central Asia III Clade (3.6.3 and 3.6.2), 3.7.18 (MSM Clade 3), and 3.7.30.4.1 (a Subclade associated with transmission among Orthodox Jewish Communities) were predominately non-killing with the remaining Subclades being predominately killing (Fig. 1). However, differences among isolates belonging to the same Subclade (i.e., epidemiological replicates) demonstrated phenotypic variation (e.g., genotype 3.7.18 where isolates ranged from 0.1% to 88.44% with a mean of 25.15%), highlighting the value of the BPER approach when assaying clinical isolates for inference at an epidemiological level.

To further explore the relevance of this phenotype for *S. sonnei* in the real world, we also determined killing phenotypes of the *S. sonnei* collection against clinical *E. coli* isolates, including both commensal and other pathogenic types. As expected, clinical isolates of *E. coli* exhibited greater levels of survival from the *S. sonnei* competitors (Supplementary Figure S3, Supplementary Table S1). Interestingly, the degree of *E. coli* killing by the *S. sonnei* strains used scaled intuitively with the nature of the *E. coli* strain (i.e., killing of lab strain > commensal strain > pathogenic strains) and the colicin and colicin-related protein content of the *E. coli* strains (see below). Specifically, and critically for the translatability of these results, the commensal Multi

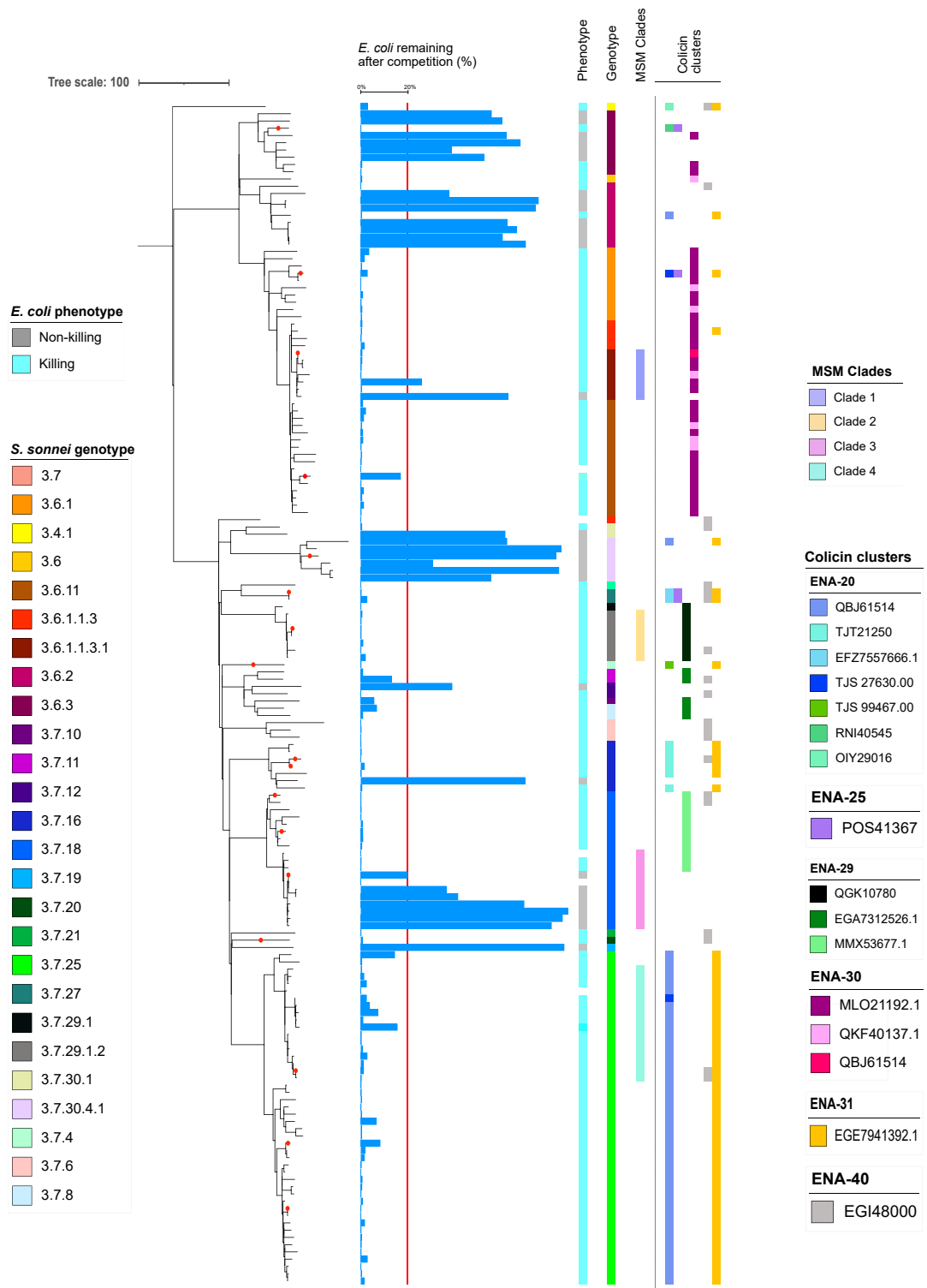


Fig. 1: The distribution of *E. coli* killing activity and colicin clusters associated with the phenotype across genotypically diverse Lineage 3 *S. sonnei*. The tree is a rooted maximum likelihood phylogeny for 165 *S. sonnei* Lineage 3 isolates. Red circles overlaying terminal branches/nodes indicate isolates which were utilised for colicin assay and mass spectrometry. The horizontal blue bars show a continuous measure of *E. coli* killing (GFP%—see methods) with a vertical red line highlighting a cut off ($\leq 20\%$) for *E. coli* killing. A binary killing/non-killing phenotype

Locus Sequence Type 10 (ST10) was killed by a greater proportion of *S. sonnei* strains than the other, more pathogenic sequence types (STs) (55/159 (35% 95% Confidence Interval [CI] 23%–43%) compared with 10% (16/159, 95% CI 4–24%) for ST6199 and 8% (12/159, 95% CI 7–23%) for ST131, [Supplementary Figure S3](#), [Supplementary Table S1](#)).

GWAS indicates that colicins are responsible for *E. coli* killing in *S. sonnei*

To identify genetic factors responsible for *E. coli* killing, we conducted bGWAS for association with the *E. coli* killing phenotype (using pyseer and MG1655, see methods) and focused on those results that related to predicted/annotated genes. This revealed a variety of genetic factors that were significantly positively associated with the *E. coli* killing phenotype including 3187 kmers within 22 genes (short sequence fragments of length $k = 10$ – 100 , $\text{max}p > 15$) and 64 clustered orthologous groups (COGs) (lrt p -value < 0.05) ([Supplementary Table S2](#)).

Investigating the 22 genes which contained kmers significantly associated with killing revealed one hypothetical protein encoding gene and 21 of known function; six of which were colicin related. These were IBDECAP1_05363, *cim*, *cnl*, *cea*, *ceaC* and *col* ([Fig. 2](#), [Supplementary Table S2](#)). IBDECAP1_05363 was the strongest result (i.e., had the highest effect size and lowest p -value, see [Fig. 2](#)) and displayed 99% similarity to the *E. coli* E1 colicin immunity protein. The *cim* gene was originally described on the *E. coli* plasmid CloDF13 and is known to be bacteriocinogenic and *cnl* encodes a lysis protein for colicin N originally described as encoded on the *E. coli* plasmid pCHAP4.^{56,57} The genes *cea*, *col* and *ceaC* encode for the colicins E1, E2 and E3 respectively and were originally identified on small plasmids ColE1, ColE2 and ColE3.^{58,59} In further support of the contribution of colicins to the killing phenotype, two of these genes (*cnl* and *ceaC*) were the first and ninth best supported genes in the COG analysis, and a COG analysis using an alternative GWAS approach (scoary, see methods) also identified the colicin related genes *imm* and *cnl* as strongly associated with the *E. coli* killing phenotype ([Supplementary Table S2](#)). Owing to the significant burden of evidence that colicins were responsible for the *E. coli* killing phenotype, we explored the distribution of these proteins further (see below).

Genes containing kmers positively associated with the killing phenotype that were not obviously related to colicins included phage related genes ($n = 4$), T3SS related genes ($n = 3$), DNA modification/binding genes ($n = 2$), protein deglycase gene ($n = 1$) and plasmid replication/

transfer genes ($n = 5$) ([Supplementary Table S2](#)). Notably, the plasmid replication/transfer genes from the kmer analysis (KENDMLBB_03776, BNHHFJPC_03747, PFCCDMEB_03709, BNHHFJPC_03743 and IBDECAP1_04568) encoded for replication protein B (IBDECAP1_04568), repE (BNHHFJPC_03743) with the latter (RepE protein) also being present in the COG analysis. Replication protein B and RepE have been shown to initiate replication of both chromosomal segments and plasmids within *E. coli* highlighting its potential for initiation of replication of small plasmids, such as those encoding colicins.⁶⁰ It is possible that these plasmid-related genes were associated to the killing phenotype by virtue of their co-location with colicin-related genes.

Various colicins are widely distributed in *S. sonnei*

To determine the distribution of colicins in *S. sonnei* we screened the genomes against a custom database of >10,000 colicin sequences that grouped into 145 clusters (methods). Although this revealed that widespread distribution of colicins (all isolates contained ≥ 1 colicin), no single colicin or cluster showed perfect concordance with the presence of the killing phenotype across *S. sonnei* ([Supplementary Table S1](#), [Fig. 1](#)), suggesting no single protein was responsible for the phenotype. To determine which colicin clusters were most likely responsible for the killing phenotype, we determined the association of colicin clusters with the binary *E. coli* killing phenotype and ordered cluster inclusion based on statistical support for the association with the phenotype (i.e., starting with the lowest p -value first) with each cluster being added until all *E. coli* killing could be explained without clusters overlapping with the non-killing phenotype ([Fig. 1](#)). This process resulted in six key clusters being identified that explain the distribution of the *E. coli* killing in *S. sonnei*.

To further validate the association of colicins with the *E. coli* killing phenotype, we selected 15 isolates representative of the breadth of the key colicin clusters distributed throughout the phylogeny and two isolates that did not display *E. coli* killing as controls ([Fig. 1](#)). We then extracted culture supernatants of these isolates ($n = 17$) to confirm the presence of the colicins in the supernatant. Laboratory assay for contact-independent killing confirmed that filtered supernatants from the 15 colicin cluster-containing *S. sonnei* killed *E. coli* MG1655 while those from the two non-killing isolates did not ([Supplementary Figure S2](#)). Mass spectrometry on filtered supernatants (details in [Supplementary Appendix](#)) from all isolates (100%, 15 of 15) that displayed *E. coli* killing contained at least one contributing colicin in the total

determined by plate reading is depicted in the colour strip closest to the tree followed by *S. sonnei* genotype, assignment to co-circulating MSM clades, and key colicins clusters associated with the killing phenotype. Individual colicins are shown by different colours labelled, by their European Nucleotide Archive accession numbers) and are grouped (and in columns) by arbitrarily named genetic clusters generated by the ARIBA package (see methods and [Supplementary Table S2](#)).

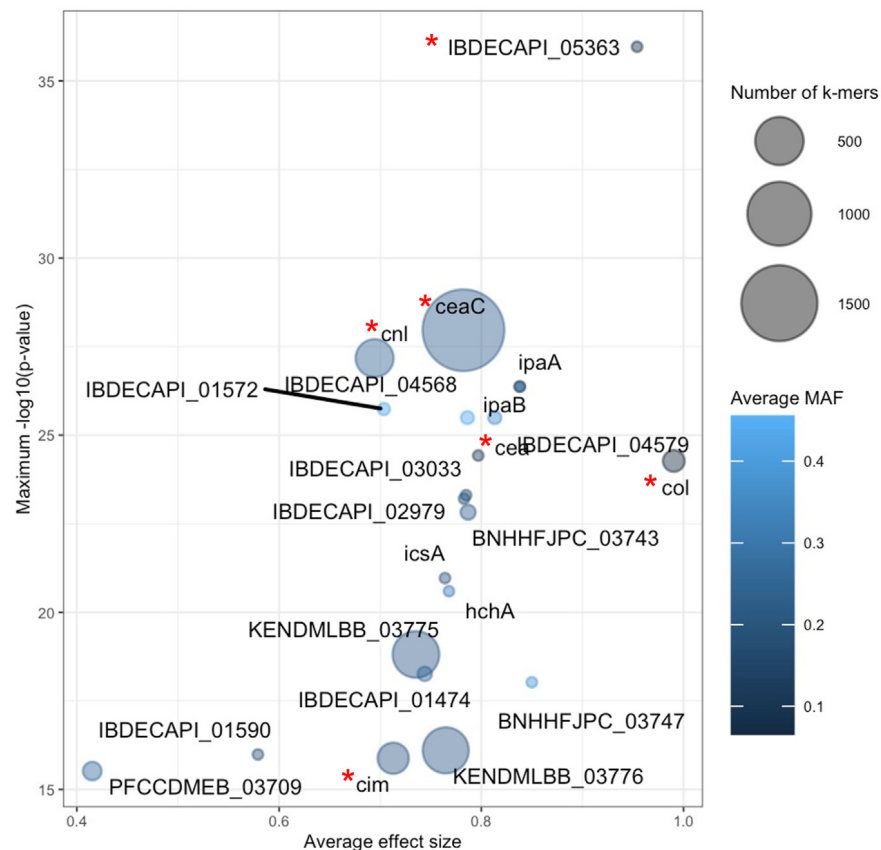


Fig. 2: Genes associated with *E. coli* killing across *S. sonnei* (including measures of association). The bubble plot shows the genes (text labels in graph field) associated with the *E. coli* killing phenotype. Each gene is represented by a bubble scaled in size by the number of sequence elements (kmers) contained within the gene that were associated with the killing phenotype. The position on the axes captures the effect size (x-axis) and statistical support (y-axis as negative logarithm of the p-value) for the association with the killing phenotype. The bubbles are coloured according to the average Minor Allele Frequency (MAF) of the kmers relating to the gene according to the inlaid heat map. Red stars indicate those genes with colicin or colicin-related function.

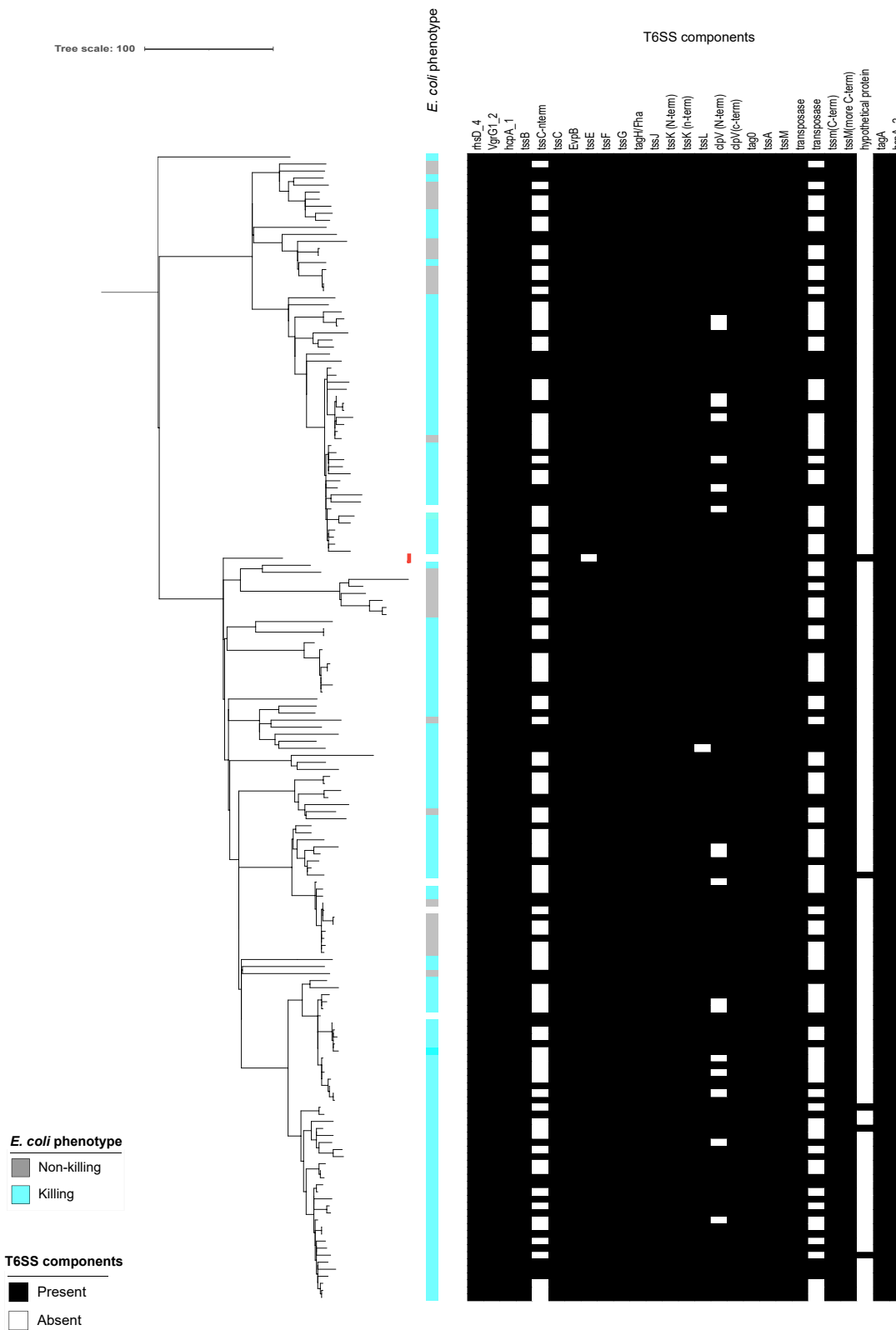
peptides identified in the samples and, for 87% (13 of 15) of isolates, the proteins matched to a unique peptide sequence of an individual colicin (Supplementary Table S3). Mass spectrometry also confirmed that, the supernatants from the two isolates that did not display *E. coli* killing did not yield any matches to these colicin sequences further confirming the role of colicins in *E. coli* killing (Supplementary Table S3).

To interpret our varied killing results across *E. coli* strains we also screened these strains against the colicin database. The screened genomes of the *E. coli* challenge strains revealed that while the MG1655 and ST10 strains both contained only two (and identical) colicin and colicin related proteins, the ST6199 and ST131 strains contained an additional five proteins each (Supplementary Table S6, see below and methods).

***E. coli* killing *in vitro* in *S. sonnei* is not mediated by T6SS**

Our results highlight the critical role of colicins in mediating *in vitro* *E. coli* killing in *S. sonnei*. As a

previous study described a functional T6SS in *S. sonnei* clinical isolate CIP 106347 that was hypothesised to contribute to competition with *E. coli* and *S. flexneri*, we also explored the possible role of the putative T6SS in *E. coli* killing.²⁴ To do this we re-sequenced CIP106347 and extracted the gene sequences for predicted proteins in the region of the T6SS system. Predicted proteins were used as the reconstituted locus was inconsistent with that originally described²⁴ and contained multiple interruptions that would render the apparatus non-functional (Supplementary Figure S4). The assembly is available in GenBank under accession number CP109775.1 and the T6SS locus is at coordinates 3535861–3560362. In fact, one or more of the key components of the T6SS (e.g., N terminus of TssC) were absent in 100% of our isolates and in CIP 106347, suggesting that the T6SS in *S. sonnei* is likely non-functional (Fig. 3). Consistent with this suggestion is the lack of a correlation between the presence and absence of components of the CIP 106347 T6SS locus



and the killing phenotype in our studies (Fig. 3), though notably our liquid media experimental model is insufficient to evaluate a functional T6SS. Thus, the T6SS genotypic profiles suggest that T6SS is not responsible for our phenotype and is likely non-functional across Lineage 3 *S. sonnei*.

Discussion

Outcompeting commensals like *E. coli* in the gut is an important aspect for *Shigella* for surviving and establishing in their niche. Since *Shigella* is known to have a relatively lower infectious dose, we can expect that the mechanisms by which *Shigella* establishes itself are relatively efficient.⁶¹ Therefore, it is important to investigate these mechanisms to better understand the dynamics of the complex gut microbial communities that lead to infection, and correlate this with established epidemiological understandings. While there will be several mechanisms at play in the complex environments and microbial communities that the pathogens live in, we demonstrated here the crucial role colicins play in interbacterial competition with *E. coli* and the potential consequences of their actions at an epidemiological level.^{62,63} The important role of colicins in the genus *Shigella* could be further evidenced by recent reports of colicins being discovered in *S. flexneri* 2a⁶⁴ and a previous description of colicin plasmid acquisition in establishing *S. sonnei* in Vietnam.⁴⁵ Our findings strengthen this evidence base by our use of a diverse collection of real-world isolates and assay of the phenotype with replication at an epidemiologically relevant level through BPER.

The high prevalence of *E. coli* killing throughout the *S. sonnei* phylogeny suggests that this is an epidemiologically important phenotype. This is further supported by the only non-killing Subclade (3.7.18, Global III subclade (MSM-associated Clade 3)) being outcompeted by *E. coli* killing Subclades (CipR MSM1 (3.6.1.1.3.1), MSM4 (3.7.25), and VN2 MSM2 (3.7.29.1.2)) in a scenario where the Subclades were known to be co-circulating in a single patient population.¹⁶ Of course, phenotypes other than *E. coli* killing will also contribute to the competition dynamics among different genotypes. Indeed, our previous work identified that Subclade 3.7.18 was also comparatively distinct in lacking a low fitness cost azithromycin resistance plasmid, pKSR100.^{16,46} Non-killing phenotypes were also conserved in other Subclades of Central Asia III (3.6.2 and 3.6.3) and 3.7.40.1 (Global III OJC). For the majority

of Lineage 3 clades, the *E. coli* killing ability was conserved through clade expansion indicating its potential to contribute to the global success of Lineage 3 *S. sonnei*. However, it is important to consider the real-world relevance of our findings. Our extended BPER experiments with other *E. coli* competitors showed that the killing phenotype is less prominent in clinical isolates. This may be due to a variety of factors, including the presence of the O-antigen in the clinical isolates which has previously been shown reduce colicin activity.⁶⁵ Importantly however, our killing phenotype was more concordant with killing of ST10, a common commensal ST which represents the type of *E. coli* most likely to be competing with *S. sonnei*. Bacteriocins have previously been shown to be important in the virulence of pathogenic extraintestinal *E. coli*⁶⁶ and this is via a number of different mechanisms of actions for those colicins present.³⁰ Consistent with this finding, *S. sonnei* were less able to kill the pathogenic ST6199 and ST131 *E. coli* strains, which contained more colicins and colicin immunity proteins than MG1655 and ST10. Hence, we have shown that colicins are the key driving factor responsible for *E. coli* killing with relevance to commensal strains.

We advocate the BPER approach as a way of assessing the phenotypes in an epidemiologically relevant way. Since most studies carry out laboratory experiments of phenotypes using either type strains or a limited number of clinical isolates, the level of applicability of what could occur in a real-world setting might not be fully captured. Therefore, we propose that using a collection of real-world isolates in laboratory phenotype experiments and having epidemiological replicates where possible rather than biological replicates offer greater insight into relevant pathogen biology. We found that, in the case of this phenotype, BPER could be implemented in a simple, cost-effective experimental setup with no/minimal compromise on accuracy (only two mismatches between the experiments using flow cytometry and plate reader, [Supplementary Table S1](#)). Here, by working with a real-world isolate collection with known epidemiological outcomes we could work backwards to identify the factors that helped shape the observed epidemiology and deepen our understanding of the biology in a targeted, comparatively rapid manner.

We have shown that *in vitro* *E. coli* killing by *S. sonnei* is common (although the killing percentage reduced with the use of clinically isolated *E. coli* strains possibly due to bacteriocins produced by those *E. coli* strains⁶⁷) and likely mediated by colicins not via a T6SS, as

Fig. 3: Genotypic T6SS profiles across Lineage 3 *S. sonnei*. The tree is a rooted maximum likelihood phylogeny for 165 *S. sonnei* Lineage 3 isolates. A red colour block is shown to the right of the CIP 106347 isolate (in which the T6SS was previously described). The killing/non-killing phenotype is depicted in the colour strip closest to the tree followed by colour strips depicting the presence/absence of individual T6SS components, both coloured according to the inlaid keys.

previously suggested.²⁴ This was supported by the lack of a fully intact T6SS in any of the isolates under study and no association of putative T6SS components with the killing phenotype. However, it is important to note that T6SS is a contact-dependent killing mechanism that would be more appropriately evaluated by *in vivo* experiments in animal models. However, this would be an inappropriate experiment to undertake with a large bank of strains, and unnecessary given that the genomic evidence suggests there are no intact T6SS. We did however find that our liquid media competition experiments matched the outcomes of our initial solid-media experiments for a subset of strains (Supplementary Figure S1, Supplementary Table S1), consistent with the killing phenotype being driven by colicins. Furthermore, this is well supported by associations between colicin clusters and the *E. coli* killing phenotype and confirmation of the secretion and functionality of colicins *in vitro*.

Excitingly, our work also identified several novel genes that were associated with the *E. coli* killing phenotype not known to be part of colicin synthesis or activity (i.e., four phage related genes and one hypothetical gene). These may have some currently unknown relationship with the colicins (e.g., phage proteins may be involved in the mobility of the colicin plasmids) or have as yet unknown functions. In any case, these genes represent ideal candidates for future studies investigating the mechanisms of interbacterial competition in *Shigella*. Furthermore, although, not practicable at the scale used in this study, mutation experiments with individual isolates are needed to definitively confirm (or reconfirm) the colicin-mediated killing (and/or immunity). However, previous work has shown that colicins produced by *S. sonnei* facilitate *E. coli* killing further supporting our findings.⁶⁸ Ultimately testing mutants of colicins, their immunity proteins, and associated genes of unknown function in *in vivo* models represent exciting avenues of future research to explore the mechanisms more fully. Meanwhile, at an epidemiological scale, our BPER approach has demonstrated the likely importance of interbacterial competition from a panel of diverse strains supporting the importance of this phenotype in shaping bacterial population dynamics.

Contributors

P.M.D.S.—Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing—original draft, Writing—Review & editing, Visualisation, R.J.B.—Methodology, Software, Formal analysis, Investigation, Writing—original draft, Writing—Review & editing, Visualisation.

L.K.—Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing—Review & editing, Visualisation.

P.N.—Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing—Review & editing, Visualisation.

L.D.—Methodology, Writing—Review & editing.

E.N.—Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing—Review & editing.

B.H.—Conceptualisation, Supervision, Writing Review & editing, Supervision.

F.X.W.—Conceptualisation, Resources, Writing—Review & editing, Supervision.

B.S.M.—Conceptualisation, Resources, Writing—Review & editing, Supervision.

C.J.—Conceptualisation, Resources, Writing—Review & editing.

K.S.B.—Conceptualisation, Methodology, Formal analysis, Resources, Writing—original draft, Writing—Review & editing, Visualisation, Supervision, Funding acquisition.

Data sharing statement

Sequencing data for all isolates are deposited in the European Nucleotide Archive and individual accession numbers are provided in Supplementary Table S1.

The colicin sequence database used in this study is publicly available through figshare via <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.20768260.v1>.

Mass spectrometry data are deposited in the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD036656.

Declaration of interests

Authors declare no competing interests.

Acknowledgements

P.M.D.S and K.S.B. are supported by a Biotechnology and Biological Sciences Research Council project grant BB/V009184/1. R.J.B is funded by a Biotechnology and Biological Sciences Research Council Doctoral Training Partnership studentship BB/M011186/1. K.S.B was also supported by a Wellcome Trust Clinical Research Career Development Award 106690/A/14/Z and drew on funding from Medical Research Council MR/R020787/1. K.S.B is affiliated to the National Institute for Health Research Health Protection Research Unit (NIHR-HPRU) in Gastrointestinal Infections at University of Liverpool in partnership with the United Kingdom Health Security Agency (UKHSA), in collaboration with University of Warwick. The views expressed are those of authors and not necessarily those of the NHS, NIHR, Department of Health and Social Care or UKHSA. Authors acknowledge the staff and facilities of GeneMill foundry, Shared Research Facilities, University of Liverpool for their help in setting up and the use of cell sorting facilities. The mass spectrometry instrumentation was funded by the LABEX: ANR-10-LABX-0036 NETRNA, a funding from the state managed by the French National Research Agency as part of the investments for the future program. Authors would like to thank Michael Bottery (University of Manchester) for his kind gift of *E. coli* MG1655 strain and Serge Mostowy (London School of Hygiene and Tropical Medicine) for kindly providing the GFP reporter plasmid used in this study.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104822>.

References

- Bardhan P, Faruque AS, Naheed A, Sack DA. Decrease in shigellosis-related deaths without *Shigella* spp.-specific interventions, Asia. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(11):1718–1723.
- Khalil IA, Troeger C, Blacker BF, et al. Morbidity and mortality due to shigella and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea: the global burden of disease study 1990–2016. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(11):1229–1240.
- Baker KS, Dallman TJ, Ashton PM, et al. Intercontinental dissemination of azithromycin-resistant shigellosis through sexual transmission: a cross-sectional study. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(8):913–921.
- Ingle DJ, Easton M, Valcanis M, et al. Co-Circulation of multidrug-resistant *Shigella* among men who have sex with men in Australia. *Clin Infect Dis*. 2019;69(9):1535–1544.
- Thompson CN, Duy PT, Baker S. The rising dominance of *Shigella sonnei*: an intercontinental shift in the etiology of bacillary dysentery. *PLoS Neglected Trop Dis*. 2015;9(6):e0003708.
- Simms I, Field N, Jenkins C, et al. Intensified shigellosis epidemic associated with sexual transmission in men who have sex with

- men–*Shigella flexneri* and *S. sonnei* in England, 2004 to end of February 2015. *Euro Surveill.* 2015;20(15):21097.
- 7 Bardsley M, Jenkins C, Mitchell HD, et al. Persistent transmission of shigellosis in England is associated with a recently emerged multidrug-resistant strain of *Shigella sonnei*. *J Clin Microbiol.* 2020;58(4).
 - 8 Charles H, Prochazka M, Thorley K, et al. Outbreak of sexually transmitted, extensively drug-resistant *Shigella sonnei* in the UK, 2021–22: a descriptive epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2022;22:1503.
 - 9 Chung The H, Rabaa MA, Pham Thanh D, et al. South Asia as a reservoir for the global spread of ciprofloxacin-resistant *Shigella sonnei*: a cross-sectional study. *PLoS Med.* 2016;13(8):e1002055.
 - 10 Fischer N, Maex M, Mattheus W, et al. Genomic epidemiology of persistently circulating MDR *Shigella sonnei* strains associated with men who have sex with men (MSM) in Belgium (2013–19). *J Antimicrob Chemother.* 2021;77(1):89–97.
 - 11 Locke RK, Greig DR, Jenkins C, Dallman TJ, Cowley LA. Acquisition and loss of CTX-M plasmids in *Shigella* species associated with MSM transmission in the UK. *Microb Genom.* 2021;7(8):000644.
 - 12 Zayet S, Klopfenstein T, Pierron A, et al. *Shigella sonnei*, an emerging multidrug-resistant sexually transmitted pathogen in Franche-Comte, France. *Emerg Microbes Infect.* 2021;10(1):1702–1705.
 - 13 Moreno-Mingorance A, Espinal P, Rodriguez V, et al. Circulation of multi-drug-resistant *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* among men who have sex with men in Barcelona, Spain, 2015–2019. *Int J Antimicrob Agents.* 2021;58(3):106378.
 - 14 Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(3):318–327.
 - 15 Hawkey J, Paranagama K, Baker KS, et al. Global population structure and genotyping framework for genomic surveillance of the major dysentery pathogen, *Shigella sonnei*. *Nat Commun.* 2021;12(1):2684.
 - 16 Baker KS, Dallman TJ, Field N, et al. Horizontal antimicrobial resistance transfer drives epidemics of multiple *Shigella* species. *Nat Commun.* 2018;9(1):1462.
 - 17 Anderson M, Sansonetti PJ, Marteyn BS. *Shigella* diversity and changing landscape: insights for the twenty-first century. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:45.
 - 18 MacIntyre DL, Miyata ST, Kitaoka M, Pukatzki S. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system displays antimicrobial properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(45):19520–19524.
 - 19 Hsieh PF, Lu YR, Lin TL, Lai LY, Wang JT. *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system contributes to bacterial competition, cell invasion, type-1 fimbriae expression, and in vivo colonization. *J Infect Dis.* 2019;219(4):637–647.
 - 20 Sibilelli-Sousa S, de Araujo-Silva AL, Hespagnol JT, Bayer-Santos E. Revisiting the steps of *Salmonella* gut infection with a focus on antagonistic interbacterial interactions. *FEBS J.* 2022;289(14):4192–4211.
 - 21 Sana TG, Flaughnatti N, Lugo KA, et al. *Salmonella* Typhimurium utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(34):E5044–E5051.
 - 22 Myers-Morales T, Oates AE, Byrd MS, Garcia EC. Burkholderia cepacia complex contact-dependent growth inhibition systems mediate interbacterial competition. *J Bacteriol.* 2019;201(12):e00012.
 - 23 Sorbara MT, Pamer EG. Interbacterial mechanisms of colonization resistance and the strategies pathogens use to overcome them. *Mucosal Immunol.* 2019;12(1):1–9.
 - 24 Anderson MC, Vonaesch P, Saffarian A, Marteyn BS, Sansonetti PJ. *Shigella sonnei* encodes a functional T6SS used for interbacterial competition and niche occupancy. *Cell Host Microbe.* 2017;21(6):769–776.e3.
 - 25 Coulthurst S. The Type VI secretion system: a versatile bacterial weapon. *Microbiology (Read).* 2019;165(5):503–515.
 - 26 Zoued A, Brunet YR, Durand E, et al. Architecture and assembly of the Type VI secretion system. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843(8):1664–1673.
 - 27 Cianfanelli FR, Monlezun L, Coulthurst SJ. Aim, load, fire: the type VI secretion system, a bacterial nanoweapon. *Trends Microbiol.* 2016;24(1):51–62.
 - 28 Lazdunski CJ, Bouveret E, Rigal A, Journet L, Lloubes R, Benedetti H. Colicin import into *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol.* 1998;180(19):4993–5002.
 - 29 Riley MA. Molecular mechanisms of colicin evolution. *Mol Biol Evol.* 1993;10(6):1380–1395.
 - 30 Cascales E, Buchanan SK, Duche D, et al. Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007;71(1):158–229.
 - 31 Yamada M, Ebina Y, Miyata T, Nakazawa T, Nakazawa A. Nucleotide sequence of the structural gene for colicin E1 and predicted structure of the protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(9):2827–2831.
 - 32 Pugsley AP, Goldzahl N, Barker RM. Colicin E2 production and release by *Escherichia coli* K12 and other Enterobacteriaceae. *J Gen Microbiol.* 1985;131(10):2673–2686.
 - 33 Horak V. Seventy colicin types of *Shigella sonnei* and an indicator system for their determination. *Zentralbl Bakteriol.* 1994;281(1):24–29.
 - 34 Mavridou DAI, Gonzalez D, Kim W, West SA, Foster KR. Bacteria use collective behavior to generate diverse combat strategies. *Curr Biol.* 2018;28(3):345–355.e4.
 - 35 Cornforth DM, Foster KR. Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(4):285–293.
 - 36 Gillor O, Giladi I, Riley MA. Persistence of colicinogenic *Escherichia coli* in the mouse gastrointestinal tract. *BMC Microbiol.* 2009;9:165.
 - 37 Kirkup BC, Riley MA. Antibiotic-mediated antagonism leads to a bacterial game of rock-paper-scissors in vivo. *Nature.* 2004;428(6981):412–414.
 - 38 Riley MA, Gordon DM. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol.* 1999;7(3):129–133.
 - 39 Chung The H, Boinett C, Pham Thanh D, et al. Dissecting the molecular evolution of fluoroquinolone-resistant *Shigella sonnei*. *Nat Commun.* 2019;10(1):1–13.
 - 40 Chung The H, Rabaa MA, Thanh DP, et al. Introduction and establishment of fluoroquinolone-resistant *Shigella sonnei* into Bhutan. *Microb Genom.* 2015;1(6):e000042–e.
 - 41 Baker K, Dallman T, Field N, et al. *Genomic epidemiology of Shigella in the United Kingdom shows transmission of pathogen sublineages and determinants of antimicrobial resistance.* 2018.
 - 42 Baker KS, Dallman TJ, Behar A, et al. Travel- and community-based transmission of multidrug-resistant *Shigella sonnei* lineage among international orthodox Jewish communities. 2016;22(9):1545–1553.
 - 43 Holt KE, Baker S, Weill FX, et al. *Shigella sonnei* genome sequencing and phylogenetic analysis indicate recent global dissemination from Europe. *Nat Genet.* 2012;44(9):1056–1059.
 - 44 Baker KS, Campos J, Pichel M, et al. Whole genome sequencing of *Shigella sonnei* through PulseNet Latin America and Caribbean: advancing global surveillance of foodborne illnesses. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(11):845–853.
 - 45 Holt KE, Thieu Nga TV, Thanh DP, et al. Tracking the establishment of local endemic populations of an emergent enteric pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(43):17522–17527.
 - 46 Malaka De Silva P, Stenhouse GE, Blackwell GA, et al. A tale of two plasmids: contributions of plasmid associated phenotypes to epidemiological success among *Shigella*. *Proc Biol Sci.* 2022;289(1980):20220581.
 - 47 Letunic I, Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(W1):W293–W296.
 - 48 Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol.* 2017;13(6):e1005595.
 - 49 Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014;30(14):2068–2069.
 - 50 Page AJ, Cummins CA, Hunt M, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics.* 2015;31(22):3691–3693.
 - 51 Lees JA, Galardini M, Bentley SD, Weiser JN, Corander J, pyseer: a comprehensive tool for microbial pangenome-wide association studies. *Bioinformatics.* 2018;34(24):4310–4312.
 - 52 Brynildsrud O, Bohlin J, Scheffer L, Eldholm V. Rapid scoring of genes in microbial pan-genome-wide association studies with Scoary. *Genome Biol.* 2016;17(1):238.
 - 53 Hahn-Lobmann S, Stephan A, Schulz S, et al. Colicins and salmocins—new classes of plant-made non-antibiotic food antibacterials. *Front Plant Sci.* 2019;10:437.
 - 54 Inouye M, Dashnow H, Raven LA, et al. SRST2: rapid genomic surveillance for public health and hospital microbiology labs. *Genome Med.* 2014;6(11):90.

- 55 Li W, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 2006;22(13):1658–1659.
- 56 Pugsley AP. The immunity and lysis genes of ColN plasmid pCHAP4. *Mol Gen Genet*. 1988;211(2):335–341.
- 57 Nijkamp HJ, de Lang R, Stuitje AR, van den Elzen PJ, Veltkamp E, van Putten AJ. The complete nucleotide sequence of the bacteriocinogenic plasmid CloDF13. *Plasmid*. 1986;16(2):135–160.
- 58 Bishop JG 3rd, Hunt JA. DNA divergence in and around the alcohol dehydrogenase locus in five closely related species of Hawaiian *Drosophila*. *Mol Biol Evol*. 1988;5(4):415–431.
- 59 Watson R, Rowsome W, Tsao J, Visentin LP. Identification and characterization of Col plasmids from classical colicin E-producing strains. *J Bacteriol*. 1981;147(2):569–577.
- 60 Miller C, Cohen SN. Separate roles of *Escherichia coli* replication proteins in synthesis and partitioning of pSC101 plasmid DNA. *J Bacteriol*. 1999;181(24):7552–7557.
- 61 Porter CK, Thura N, Ranallo RT, Riddle MS. The *Shigella* human challenge model. *Epidemiol Infect*. 2013;141(2):223–232.
- 62 Lindsay B, Oundo J, Hossain MA, et al. Microbiota that affect risk for shigellosis in children in low-income countries. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(2):242–250.
- 63 Pop M, Walker AW, Paulson J, et al. Diarrhea in young children from low-income countries leads to large-scale alterations in intestinal microbiota composition. *Genome Biol*. 2014;15(6):R76.
- 64 Torrez Lamberti MF, Teran LC, Lopez FE, de Las Mercedes Pescaretti M, Delgado MA. Genomic and proteomic characterization of two strains of *Shigella flexneri* 2 isolated from infants' stool samples in Argentina. *BMC Genom*. 2022;23(1):495.
- 65 Sharp C, Boinett C, Cain A, et al. O-Antigen-Dependent colicin insensitivity of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2019;201(4).
- 66 Micenkova L, Staudova B, Bosak J, et al. Bacteriocin-encoding genes and ExPEC virulence determinants are associated in human fecal *Escherichia coli* strains. *BMC Microbiol*. 2014;14:109.
- 67 Bosak J, Hrala M, Micenkova L, Smajs D. Non-antibiotic antibacterial peptides and proteins of *Escherichia coli*: efficacy and potency of bacteriocins. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2021;19(3):309–322.
- 68 Calcuttawala F, Hariharan C, Pazhani GP, Ghosh S, Ramamurthy T. Activity spectrum of colicins produced by *Shigella sonnei* and genetic mechanism of colicin resistance in conspecific *S. sonnei* strains and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(1):152–158.

Bibliographie

1. G. 2017 C. of D. Collaborators, *et al.*, Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* **392**, 1736–1788 (2018).
2. G. 2017 D. D. Collaborators, *et al.*, Quantifying risks and interventions that have affected the burden of diarrhoea among children younger than 5 years: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Infect. Dis.* **20**, 37–59 (2020).
3. U. S. I. for H. M. and E. (IHME), Global Burden of Disease Study 2019 (GBD 2019) Results. Global Burden of Disease Collaborative Network.
4. G. D. D. Collaborators, *et al.*, Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect. Dis.* **17**, 909–948 (2017).
5. C. Troeger, *et al.*, Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect. Dis.* **18**, 1211–1228 (2018).
6. T. Varghese, G. Kang, A. D. Steele, Understanding Rotavirus Vaccine Efficacy and Effectiveness in Countries with High Child Mortality. *Vaccines* **10**, 346 (2022).
7. K. A. Lampel, S. B. Formalt, A. T. Maurelli, A Brief History of Shigella. *EcoSal Plus* **8** (2018).
8. M. Anderson, P. J. Sansonetti, B. S. Marteyn, Shigella Diversity and Changing Landscape: Insights for the Twenty-First Century. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **6**, 45 (2016).
9. B. Marteyn, A. Gazi, P. Sansonetti, Shigella. *Gut Microbes* **3**, 104–120 (2012).
10. I. Paciello, *et al.*, Intracellular Shigella remodels its LPS to dampen the innate immune recognition and evade inflammasome activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E4345–E4354 (2013).
11. M. M. Raso, V. Arato, G. Gasperini, F. Micoli, Toward a Shigella Vaccine: Opportunities and Challenges to Fight an Antimicrobial-Resistant Pathogen. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 4649 (2023).
12. D. P. M. Sethuvel, N. K. D. Ragupathi, S. Anandan, B. Veeraraghavan, Update on: Shigella new serogroups/serotypes and their antimicrobial resistance. *Lett. Appl. Microbiol.* **64**, 8–18 (2017).
13. B. Liu, *et al.*, Structure and genetics of Shigella O antigens. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 627–653 (2008).
14. D. J. Brenner, G. R. Fanning, A. G. Steigerwalt, I. Ørskov, F. Ørskov, Polynucleotide Sequence Relatedness Among Three Groups of Pathogenic Escherichia coli Strains. *Infect. Immun.* **6**, 308–315 (1972).

15. G. N. Schroeder, H. Hilbi, Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 134–156 (2008).
16. P. J. Sansonetti, D. J. Kopecko, S. B. Formal, Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **35**, 852–860 (1982).
17. R. Lan, M. C. Alles, K. Donohoe, M. B. Martinez, P. R. Reeves, Molecular Evolutionary Relationships of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infect. Immun.* **72**, 5080–5088 (2004).
18. M. J. C. van den Beld, F. A. G. Reubsaet, Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**, 899–904 (2012).
19. P. D. Khot, M. A. Fisher, Novel Approach for Differentiating *Shigella* Species and *Escherichia coli* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 3711–3716 (2013).
20. M. A. Chattaway, U. Schaefer, R. Tewolde, T. J. Dallman, C. Jenkins, Identification of *Escherichia coli* and *Shigella* Species from Whole-Genome Sequences. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 616–623 (2017).
21. G. E. Sims, S.-H. Kim, Whole-genome phylogeny of *Escherichia coli*/*Shigella* group by feature frequency profiles (FFPs). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 8329–8334 (2011).
22. E. A. Pettengill, J. B. Pettengill, R. Binet, Phylogenetic Analyses of *Shigella* and Enteroinvasive *Escherichia coli* for the Identification of Molecular Epidemiological Markers: Whole-Genome Comparative Analysis Does Not Support Distinct Genera Designation. *Front. Microbiol.* **6**, 1573 (2016).
23. C. Buchrieser, *et al.*, The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* **38**, 760–771 (2000).
24. E. Cascales, *et al.*, Colicin Biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 158–229 (2007).
25. P. M. D. Silva, *et al.*, *Escherichia coli* killing by epidemiologically successful sublineages of *Shigella sonnei* is mediated by colicins. *eBioMedicine* **97**, 104822 (2023).
26. E. R. Green, J. Meccas, Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol. Spectr.* **4** (2016).
27. M. C. Anderson, P. Vonaesch, A. Saffarian, B. S. Marteyn, P. J. Sansonetti, *Shigella sonnei* Encodes a Functional T6SS Used for Interbacterial Competition and Niche Occupancy. *Cell Host Microbe* **21**, 769–776.e3 (2017).
28. A. B. Russell, S. B. Peterson, J. D. Mougous, Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 137–148 (2014).

29. B. Marteyn, *et al.*, Modulation of Shigella virulence in response to available oxygen in vivo. *Nature* **465**, 355–358 (2010).
30. M. E. Porter, C. J. Dorman, A role for H-NS in the thermo-osmotic regulation of virulence gene expression in Shigella flexneri. *J. Bacteriol.* **176**, 4187–4191 (1994).
31. D. M. Stoebel, A. Free, C. J. Dorman, Anti-silencing: overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria. *Microbiology* **154**, 2533–2545 (2008).
32. J.-Y. Tinevez, *et al.*, Shigella-mediated oxygen depletion is essential for intestinal mucosa colonization. *Nat. Microbiol.* **4**, 2001–2009 (2019).
33. P. J. Sansonetti, J. Mounier, Metabolic events mediating early killing of host cells infected by Shigella flexneri. *Microb. Pathog.* **3**, 53–61 (1987).
34. N. Dautin, Folding Control in the Path of Type 5 Secretion. *Toxins* **13**, 341 (2021).
35. M. Ogawa, *et al.*, Escape of Intracellular Shigella from Autophagy. *Science* **307**, 727–731 (2005).
36. M. D. Welch, M. Way, Arp2/3-Mediated Actin-Based Motility: A Tail of Pathogen Abuse. *Cell Host Microbe* **14**, 242–255 (2013).
37. I. R. Henderson, J. Czczulin, C. Eslava, F. Noriega, J. P. Nataro, Characterization of Pic, a Secreted Protease of Shigella flexneri and Enterohemorrhagic Escherichia coli. *Infect. Immun.* **67**, 5587–5596 (1999).
38. J. Xicohtencatl-Cortes, *et al.*, Bacterial Macroscopic Rope-like Fibers with Cytopathic and Adhesive Properties*. *J. Biol. Chem.* **285**, 32336–32342 (2010).
39. D. Orth, *et al.*, EspP, a Serine Protease of Enterohemorrhagic Escherichia coli, Impairs Complement Activation by Cleaving Complement Factors C3/C3b and C5. *Infect. Immun.* **78**, 4294–4301 (2010).
40. F. Navarro-Garcia, Serine proteases autotransporter of Enterobacteriaceae: Structures, subdomains, motifs, functions, and targets. *Mol. Microbiol.* **120**, 178–193 (2023).
41. N. Dautin, Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs): Biogenesis and Function. *Toxins* **2**, 1179–1206 (2010).
42. P. Pokharel, H. Habouria, H. Bessaiah, C. M. Dozois, Serine Protease Autotransporters of the Enterobacteriaceae (SPATEs): Out and About and Chopping It Up. *Microorganisms* **7**, 594 (2019).
43. R. Ieva, H. D. Bernstein, Interaction of an autotransporter passenger domain with Bama during its translocation across the bacterial outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 19120–19125 (2009).

44. A. Maldonado-Contreras, *et al.*, Shigella depends on SepA to destabilize the intestinal epithelial integrity via cofilin activation. *Gut Microbes* **8**, 544–560 (2017).
45. S. Khan, H. S. Mian, L. E. Sandercock, N. Y. Chirgadze, E. F. Pai, Crystal Structure of the Passenger Domain of the Escherichia coli Autotransporter EspP. *J. Mol. Biol.* **413**, 985–1000 (2011).
46. B. R. Otto, *et al.*, Crystal Structure of Hemoglobin Protease, a Heme Binding Autotransporter Protein from Pathogenic Escherichia coli *. *J. Biol. Chem.* **280**, 17339–17345 (2005).
47. D. M. BLOW, J. J. BIRKTOFT, B. S. HARTLEY, Role of a Buried Acid Group in the Mechanism of Action of Chymotrypsin. *Nature* **221**, 337–340 (1969).
48. F. Navarro-García, C. Sears, C. Eslava, A. Cravioto, J. P. Nataro, Cytoskeletal Effects Induced by Pet, the Serine Protease Enterotoxin of Enteroaggregative Escherichia coli. *Infect. Immun.* **67**, 2184–2192 (1999).
49. F. Ruiz-Perez, J. P. Nataro, Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 745–770 (2014).
50. W. Brunder, H. Schmidt, H. Karch, EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol. Microbiol.* **24**, 767–778 (1997).
51. K. Al-Hasani, *et al.*, The sigA Gene Which Is Borne on the she Pathogenicity Island of Shigella flexneri 2a Encodes an Exported Cytopathic Protease Involved in Intestinal Fluid Accumulation. *Infect. Immun.* **68**, 2457–2463 (2000).
52. M. E. Drago-Serrano, S. G. Parra, H. A. Manjarrez-Hernández, EspC, an autotransporter protein secreted by enteropathogenic Escherichia coli (EPEC), displays protease activity on human hemoglobin. *FEMS Microbiol. Lett.* **265**, 35–40 (2006).
53. S. J. Ellis, M. Yasir, D. F. Browning, S. J. W. Busby, S. Schüller, Oxygen and contact with human intestinal epithelium independently stimulate virulence gene expression in enteroaggregative Escherichia coli. *Cell. Microbiol.* **21**, e13012 (2019).
54. M. M. Alhammadi, *et al.*, Novel organisation and regulation of the pic promoter from enteroaggregative and uropathogenic Escherichia coli. *Virulence* **13**, 1393–1406 (2022).
55. K. Roy, *et al.*, Adhesin Degradation Accelerates Delivery of Heat-labile Toxin by Enterotoxigenic Escherichia coli *. *J. Biol. Chem.* **286**, 29771–29779 (2011).
56. M. Moosavian, G. H. Ghaderiyan, M. Shahin, T. Navidifar, First investigation of the presence of SPATE genes in Shigella species isolated from children with diarrhea infection in Ahvaz, southwest Iran. *Infect. Drug Resist.* **12**, 795–804 (2019).

57. P. C. G. Vieira, *et al.*, Secreted autotransporter toxin (Sat) induces cell damage during enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *PLoS ONE* **15**, e0228959 (2020).
58. S. K. Niyogi, M. Vargas, J. Vila, Prevalence of the sat, set and sen genes among diverse serotypes of *Shigella flexneri* strains isolated from patients with acute diarrhoea. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 574–576 (2004).
59. S. M. Harrington, *et al.*, The Pic Protease of Enteroaggregative *Escherichia coli* Promotes Intestinal Colonization and Growth in the Presence of Mucin. *Infect. Immun.* **77**, 2465–2473 (2009).
60. J. Gutiérrez-Jiménez, I. Arciniega, F. Navarro-García, The serine protease motif of Pic mediates a dose-dependent mucolytic activity after binding to sugar constituents of the mucin substrate. *Microb. Pathog.* **45**, 115–123 (2008).
61. F. Navarro-Garcia, *et al.*, Pic, an Autotransporter Protein Secreted by Different Pathogens in the Enterobacteriaceae Family, Is a Potent Mucus Secretagogue. *Infect. Immun.* **78**, 4101–4109 (2010).
62. F. Ruiz-Perez, *et al.*, Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 12881–12886 (2011).
63. A. G. Abreu, *et al.*, The Serine Protease Pic From Enteroaggregative *Escherichia coli* Mediates Immune Evasion by the Direct Cleavage of Complement Proteins. *J Infect Dis* **212**, 106–115 (2015).
64. C. A. Freire, *et al.*, Secreted Autotransporter Toxin (Sat) Mediates Innate Immune System Evasion. *Front. Immunol.* **13**, 844878 (2022).
65. Z. Benjelloun-Touimi, P. J. Sansonetti, C. Parsot, SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Mol. Microbiol.* **17**, 123–135 (1995).
66. E. Coron, *et al.*, Characterisation of Early Mucosal and Neuronal Lesions Following *Shigella flexneri* Infection in Human Colon. *PLoS ONE* **4**, e4713 (2009).
67. M. Meza-Segura, *et al.*, SepA Enhances *Shigella* Invasion of Epithelial Cells by Degrading Alpha-1 Antitrypsin and Producing a Neutrophil Chemoattractant. *Mbio* **12**, e02833-21 (2021).
68. K. Al-Hasani, F. Navarro-Garcia, J. Huerta, H. Sakellaris, B. Adler, The Immunogenic SigA Enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a Binds to HEp-2 Cells and Induces Fodrin Redistribution in Intoxicated Epithelial Cells. *PLoS ONE* **4**, e8223 (2009).
69. A. Canizalez-Roman, F. Navarro-García, Fodrin CaM-binding domain cleavage by Pet from enteroaggregative *Escherichia coli* leads to actin cytoskeletal disruption. *Mol. Microbiol.* **48**, 947–958 (2003).

70. E. G. Chua, K. Al-Hasani, M. Scanlon, B. Adler, H. Sakellaris, Determinants of Proteolysis and Cell-Binding for the *Shigella flexneri* Cytotoxin, SigA. *Curr. Microbiol.* **71**, 613–617 (2015).
71. J. Gorden, P. L. Small, Acid resistance in enteric bacteria. *Infect. Immun.* **61**, 364–367 (1993).
72. R. Yamamura, K. Y. Inoue, K. Nishino, S. Yamasaki, Intestinal and fecal pH in human health. *Front. Microbiomes* **2**, 1192316 (2023).
73. P. Small, D. Blankenhorn, D. Welty, E. Zinser, J. L. Slonczewski, Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. *J. Bacteriol.* **176**, 1729–1737 (1994).
74. S.-Y. Lu, T. Graça, J. J. Avillan, Z. Zhao, D. R. Call, Microcin PDI Inhibits Antibiotic-Resistant Strains of *Escherichia coli* and *Shigella* through a Mechanism of Membrane Disruption and Protection by Homotrimer Self-Immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* **85** (2019).
75. F. Calcuttawala, C. Hariharan, G. P. Pazhani, S. Ghosh, T. Ramamurthy, Activity Spectrum of Colicins Produced by *Shigella sonnei* and Genetic Mechanism of Colicin Resistance in Conspecific *S. sonnei* Strains and *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 152–158 (2015).
76. E. N. H. Tran, M. Papadopoulos, R. Morona, Relationship between O-antigen chain length and resistance to colicin E2 in *Shigella flexneri*. *Microbiology* **160**, 589–601 (2014).
77. A. Ascari, E. N. H. Tran, B. A. Eijkelkamp, R. Morona, Identification of the *Shigella flexneri* Wzy Domain Modulating WzzpHS-2 Interaction and Detection of the Wzy/Wzz/Oag Complex. *J. Bacteriol.* **204**, e00224-22 (2022).
78. M. Herath, S. Hosie, J. C. Bornstein, A. E. Franks, E. L. Hill-Yardin, The Role of the Gastrointestinal Mucus System in Intestinal Homeostasis: Implications for Neurological Disorders. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 248 (2020).
79. A. Brotcke Zumsteg, C. Goosmann, V. Brinkmann, R. Morona, A. Zychlinsky, IcsA Is a *Shigella flexneri* Adhesin Regulated by the Type III Secretion System and Required for Pathogenesis. *Cell Host Microbe* **15**, 435–445 (2014).
80. C. S. Faherty, J. C. Redman, D. A. Rasko, E. M. Barry, J. P. Nataro, *Shigella flexneri* effectors OspE1 and OspE2 mediate induced adherence to the colonic epithelium following bile salts exposure. *Mol. Microbiol.* **85**, 107–121 (2012).
81. A. Phalipon, P. J. Sansonetti, *Shigella's* ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival? *Immunol. Cell Biol.* **85**, 119–129 (2007).
82. P. J. Sansonetti, J. Arondel, M. Huerre, A. Harada, K. Matsushima, Interleukin-8 Controls Bacterial Transepithelial Translocation at the Cost of Epithelial Destruction in Experimental Shigellosis. *Infect. Immun.* **67**, 1471–1480 (1999).

83. M. B. Zaidi, T. Estrada-García, Shigella: A Highly Virulent and Elusive Pathogen. *Curr. Trop. Med. Rep.* **1**, 81–87 (2014).
84. A. C. André, L. Debande, B. S. Marteyn, The selective advantage of facultative anaerobes relies on their unique ability to cope with changing oxygen levels during infection. *Cell. Microbiol.* **23**, e13338 (2021).
85. E. T. Arena, J.-Y. Tinevez, G. Nigro, P. J. Sansonetti, B. S. Marteyn, The infectious hypoxia: occurrence and causes during Shigella infection. *Microbes Infect* **19**, 157–165 (2017).
86. L. Injarabian, *et al.*, Ascorbate maintains a low plasma oxygen level. *Sci. Rep.* **10**, 10659 (2020).
87. J. Skerniskyte, *et al.*, Ascorbate deficiency increases progression of shigellosis in guinea pigs and mice infection models. *Gut Microbes* **15**, 2271597 (2023).
88. C. Menge, Molecular Biology of Escherichia coli Shiga Toxins' Effects on Mammalian Cells. *Toxins* **12**, 345 (2020).
89. W. A. Khan, J. K. Griffiths, M. L. Bennish, Gastrointestinal and Extra-Intestinal Manifestations of Childhood Shigellosis in a Region Where All Four Species of Shigella Are Endemic. *PLoS ONE* **8**, e64097 (2013).
90. R. Koshi, G. Chandy, M. Mathan, V. I. Mathan, Vascular changes in duodenal mucosa in shigellosis and cholera. *Clin. Anat.* **16**, 317–327 (2003).
91. E. Lemichez, M. Lecuit, X. Nassif, S. Bourdoulous, Breaking the wall: targeting of the endothelium by pathogenic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 93–104 (2010).
92. N. M. Maroncle, K. E. Sivick, R. Brady, F.-E. Stokes, H. L. T. Mobley, Protease Activity, Secretion, Cell Entry, Cytotoxicity, and Cellular Targets of Secreted Autotransporter Toxin of Uropathogenic Escherichia coli. *Infect. Immun.* **74**, 6124–6134 (2006).
93. H. Habouria, *et al.*, Three new serine-protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs) from extra-intestinal pathogenic Escherichia coli and combined role of SPATEs for cytotoxicity and colonization of the mouse kidney. *Virulence* **10**, 568–587 (2019).
94. C. A. Freire, A. C. M. Santos, A. C. Pignatari, R. M. Silva, W. P. Elias, Serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs) are largely distributed among Escherichia coli isolated from the bloodstream. *Braz. J. Microbiol.* **51**, 447–454 (2020).
95. S. Pandey, T. Kawai, S. Akira, Microbial Sensing by Toll-Like Receptors and Intracellular Nucleic Acid Sensors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a016246 (2015).
96. N. Kuzmich, *et al.*, TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. *Vaccines* **5**, 34 (2017).

97. S. Suzuki, *et al.*, Shigella Type III Secretion Protein Mxil Is Recognized by Naip2 to Induce Nlr4 Inflammasome Activation Independently of Pkc δ . *PLoS Pathog.* **10**, e1003926 (2014).
98. A. Zychlinsky, M. C. Prevost, P. J. Sansonetti, Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* **358**, 167–169 (1992).
99. D. W. Kim, *et al.*, The Shigella flexneri effector OspG interferes with innate immune responses by targeting ubiquitin-conjugating enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 14046–14051 (2005).
100. T. Sanada, *et al.*, The Shigella flexneri effector OspI deamidates UBC13 to dampen the inflammatory response. *Nature* **483**, 623–626 (2012).
101. B. Sperandio, *et al.*, Virulent Shigella flexneri subverts the host innate immune response through manipulation of antimicrobial peptide gene expression. *J. Exp. Med.* **205**, 1121–1132 (2008).
102. K. Nothelfer, *et al.*, B lymphocytes undergo TLR2-dependent apoptosis upon Shigella infection. *J. Exp. Med.* **211**, 1215–1229 (2014).
103. H. Ashida, H. Mimuro, C. Sasakawa, Shigella Manipulates Host Immune Responses by Delivering Effector Proteins with Specific Roles. *Front. Immunol.* **6**, 219 (2015).
104. C. Konradt, *et al.*, The Shigella flexneri Type Three Secretion System Effector IpgD Inhibits T Cell Migration by Manipulating Host Phosphoinositide Metabolism. *Cell Host Microbe* **9**, 263–272 (2011).
105. M. T. Sorbara, *et al.*, Complement C3 Drives Autophagy-Dependent Restriction of Cyto-invasive Bacteria. *Cell Host Microbe* **23**, 644–652.e5 (2018).
106. N. S. Merle, S. E. Church, V. Fremeaux-Bacchi, L. T. Roumenina, Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front. Immunol.* **6**, 262 (2015).
107. N. S. Merle, R. Noe, L. Halbwachs-Mecarelli, V. Fremeaux-Bacchi, L. T. Roumenina, Complement System Part II: Role in Immunity. *Front. Immunol.* **6**, 257 (2015).
108. A. J. Laarman, *et al.*, Staphylococcus aureus Metalloprotease Aureolysin Cleaves Complement C3 To Mediate Immune Evasion. *J. Immunol.* **186**, 6445–6453 (2011).
109. S. S. Justice, D. A. Hunstad, P. C. Seed, S. J. Hultgren, Filamentation by Escherichia coli subverts innate defenses during urinary tract infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 19884–19889 (2006).
110. C. Grondin, *et al.*, Shigella flexneri Bacteremia in Two Immune-Competent Adult Travelers. *J. Travel Med.* **19**, 258–260 (2012).
111. K. Herzog, *et al.*, Diarrheagenic enteroaggregative Escherichia coli causing urinary tract infection and bacteremia leading to sepsis. *Infection* **42**, 441–444 (2014).

112. K. L. Kotloff, M. S. Riddle, J. A. Platts-Mills, P. Pavlinac, A. K. M. Zaidi, Shigellosis. *Lancet* **391**, 801–812 (2018).
113. P. Ahmadpoor, *et al.*, Physiological role of plasma and its components and the clinical implications of different methods of apheresis: A narrative review. *Ther Apher Dial* **25**, 262–272 (2021).
114. G. 2019 A. R. Collaborators, *et al.*, Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* **400**, 2221–2248 (2023).
115. I. A. Khalil, *et al.*, Morbidity and mortality due to shigella and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea: the Global Burden of Disease Study 1990–2016. *Lancet Infect. Dis.* **18**, 1229–1240 (2018).
116. K. S. Baker, *et al.*, Travel- and Community-Based Transmission of Multidrug-Resistant *Shigella sonnei* Lineage among International Orthodox Jewish Communities - Volume 22, Number 9—September 2016 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 1545–1553 (2016).
117. H. L. DuPont, M. M. Levine, R. B. Hornick, S. B. Formal, Inoculum Size in Shigellosis and Implications for Expected Mode of Transmission. *J. Infect. Dis.* **159**, 1126–1128 (1989).
118. V. GARRETT, *et al.*, A recurring outbreak of *Shigella sonnei* among traditionally observant Jewish children in New York City: the risks of daycare and household transmission. *Epidemiology amp Infect.* **134**, 1231–1236 (2006).
119. D. Genobile, *et al.*, An outbreak of shigellosis in a child care centre. *Commun. Dis. Intell. Q. Rep.* **28**, 225–9 (2004).
120. S. Lefèvre, *et al.*, Rapid emergence of extensively drug-resistant *Shigella sonnei* in France. *Nat. Commun.* **14**, 462 (2023).
121. I. G. GARITANO, *et al.*, Shigellosis outbreak linked to canteen-food consumption in a public institution: a matched case-control study. *Epidemiology Infect.* **139**, 1956–1964 (2011).
122. H. Charles, *et al.*, Outbreak of sexually transmitted, extensively drug-resistant *Shigella sonnei* in the UK, 2021–22: a descriptive epidemiological study. *Lancet Infect. Dis.* **22**, 1503–1510 (2022).
123. E. Scallan, *et al.*, Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens - Volume 17, Number 1—January 2011 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 7–15 (2011).
124. C. Jenkins, *et al.*, Foodborne Outbreak of Extended Spectrum Beta-lactamase Producing *Shigella sonnei* Associated with Contaminated Spring Onions in the United Kingdom. *J. Food Prot.* **86**, 100074 (2023).

125. D. Cohen, *et al.*, Reduction of transmission of shigellosis by control of houseflies (*Musca domestica*). *Lancet* **337**, 993–997 (1991).
126. T. H. Farag, *et al.*, Housefly Population Density Correlates with Shigellosis among Children in Mirzapur, Bangladesh: A Time Series Analysis. *PLoS Neglected Trop. Dis.* **7**, e2280 (2013).
127. T. E. Libby, *et al.*, Consequences of Shigella infection in young children: a systematic review. *Int. J. Infect. Dis.* **129**, 78–95 (2023).
128. D. W. SCHAFFNER, *et al.*, Quantitative Microbial Risk Assessment of Antibacterial Hand Hygiene Products on Risk of Shigellosis. *J. Food Prot.* **77**, 574–582 (2014).
129. G. E. FISCHLER, *et al.*, Effect of Hand Wash Agents on Controlling the Transmission of Pathogenic Bacteria from Hands to Food. *J. Food Prot.* **70**, 2873–2877 (2016).
130. S. Baker, H. C. The, Recent insights into Shigella. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **31**, 449–454 (2018).
131. V. Torraca, K. Holt, S. Mostowy, Shigella sonnei. *Trends Microbiol.* **28**, 696–697 (2020).
132. A. Moreno-Mingorance, *et al.*, Increasing trend of antimicrobial resistance in Shigella associated with MSM transmission in Barcelona, 2020–21: outbreak of XRD Shigella sonnei and dissemination of ESBL-producing Shigella flexneri. *J. Antimicrob. Chemother.* **78**, 975–982 (2023).
133. C. Haddar, E. Begaud, J. Maslin, Y. Germani, Tests de diagnostic rapide des shigelloses. *Bull. Société Pathol. Exot.* **110**, 1–8 (2017).
134. S. Pholwat, *et al.*, Use of Molecular Methods To Detect Shigella and Infer Phenotypic Resistance in a Shigella Treatment Study. *J. Clin. Microbiol.* **60**, e01774-21 (2021).
135. J. Liu, *et al.*, Use of quantitative molecular diagnostic methods to identify causes of diarrhoea in children: a reanalysis of the GEMS case-control study. *Lancet* **388**, 1291–1301 (2016).
136. V. D. Thiem, *et al.*, Detection of Shigella by a PCR Assay Targeting the ipaH Gene Suggests Increased Prevalence of Shigellosis in Nha Trang, Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 2031–2035 (2004).
137. C. Duran, *et al.*, Rapid Diagnosis of Diarrhea Caused by Shigella sonnei Using Dipsticks; Comparison of Rectal Swabs, Direct Stool and Stool Culture. *PLoS ONE* **8**, e80267 (2013).
138. F. Nato, *et al.*, Dipstick for Rapid Diagnosis of Shigella flexneri 2a in Stool. *PLoS ONE* **2**, e361 (2007).
139. N. Taneja, *et al.*, Dipstick Test for Rapid Diagnosis of Shigella dysenteriae 1 in Bacterial Cultures and Its Potential Use on Stool Samples. *PLoS ONE* **6**, e24830 (2011).

140. I. Yassine, *et al.*, Population structure analysis and laboratory monitoring of *Shigella* by core-genome multilocus sequence typing. *Nat. Commun.* **13**, 551 (2022).
141. R. I. Glass, B. J. Stoll, Oral Rehydration Therapy for Diarrheal Diseases: A 50-Year Perspective. *JAMA* **320**, 865 (2018).
142. M. Farthing, *et al.*, Acute Diarrhea in Adults and Children (2013) (September 22, 2023).
143. M. A. da C. Gouveia, M. T. C. Lins, G. A. P. da Silva, Acute diarrhea with blood: diagnosis and drug treatment. *J. Pediatr.* **96**, 20–28 (2020).
144. K. D. Tickell, *et al.*, Identification and management of *Shigella* infection in children with diarrhoea: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Heal.* **5**, e1235–e1248 (2017).
145. K. S. Baker, *et al.*, Horizontal antimicrobial resistance transfer drives epidemics of multiple *Shigella* species. *Nat. Commun.* **9**, 1462 (2018).
146. K. E. Holt, *et al.*, *Shigella sonnei* genome sequencing and phylogenetic analysis indicate recent global dissemination from Europe. *Nat. Genet.* **44**, 1056–1059 (2012).
147. M. M. S. Dallal, R. Ranjbar, M. R. Pourshafie, The study of antimicrobial resistance among *Shigella flexneri* strains isolated in Tehran, Iran. *J. Pediatr. Infect. Dis.* **6**, 125–129 (2011).
148. D. Vubil, *et al.*, Antibiotic resistance and molecular characterization of shigella isolates recovered from children aged less than 5 years in Manhica, Southern Mozambique. *Int. J. Antimicrob. Agents* **51**, 881–887 (2018).
149. D. BHATTACHARYA, *et al.*, Changing patterns and widening of antibiotic resistance in *Shigella* spp. over a decade (2000–2011), Andaman Islands, India. *Epidemiology Infect.* **143**, 470–477 (2015).
150. P. C. M. Williams, J. A. Berkley, Guidelines for the treatment of dysentery (shigellosis): a systematic review of the evidence. *Paediatr. Int. Child Heal.* **38**, S50–S65 (2018).
151. A. Phalipon, *et al.*, A Synthetic Carbohydrate-Protein Conjugate Vaccine Candidate against *Shigella flexneri* 2a Infection. *J. Immunol.* **182**, 2241–2247 (2009).
152. A. R. Oany, *et al.*, Vaccinomics Approach for Designing Potential Peptide Vaccine by Targeting *Shigella* spp. Serine Protease Autotransporter Subfamily Protein SigA. *J. Immunol. Res.* **2017**, 6412353 (2017).
153. T. S. Coster, *et al.*, Vaccination against Shigellosis with Attenuated *Shigella flexneri* 2a Strain SC602. *Infect. Immun.* **67**, 3437–3443 (1999).
154. D. Cohen, *et al.*, Double-blind vaccine-controlled randomised efficacy trial of an investigational *Shigella sonnei* conjugate vaccine in young adults. *Lancet* **349**, 155–159 (1997).

155. J. H. Passwell, *et al.*, Age-related efficacy of Shigella O-specific polysaccharide conjugates in 1–4-year-old Israeli children. *Vaccine* **28**, 2231–2235 (2010).
156. P. D. Cam, T. Pál, A. A. Lindberg, Immune response against lipopolysaccharide and invasion plasmid-coded antigens of shigellae in Vietnamese and Swedish dysenteric patients. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 454–457 (1993).
157. E. Ndungo, *et al.*, A Novel Shigella Proteome Microarray Discriminates Targets of Human Antibody Reactivity following Oral Vaccination and Experimental Challenge. *mSphere* **3**, e00260-18 (2018).
158. F. Micoli, U. N. Nakakana, F. B. Scorza, Towards a Four-Component GMMA-Based Vaccine against Shigella. *Vaccines* **10**, 328 (2022).
159. J. Skerniskyte, *et al.*, Ascorbate deficiency increases progression of shigellosis in guinea pigs and mice infection models. *Gut Microbes* **15**, 2271597 (2023).
160. Lind, J., Lind, James.)2004(. A treatise of the scurvy : in three parts, containing an inquiry into the nature, causes, and cure, of that disease, together with a critical and chronological view of what has been published on the subject / by James Lind. *Bulletin of the World Health Organization : the International Journal of Public Health* 2004 **82**796–793,)**10**((2004).
161. C. Fleischmann, *et al.*, Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **193**, 259–272 (2016).
162. R. Konrad, *et al.*, Recognizing Sepsis as a Global Health Priority — A WHO Resolution. *N. Engl. J. Med.* **377**, 414–417 (2017).
163. J. Hajj, N. Blaine, J. Salavaci, D. Jacoby, The “Centrality of Sepsis”: A Review on Incidence, Mortality, and Cost of Care. *Healthcare* **6**, 90 (2018).
164. D. J. Diekema, *et al.*, The Microbiology of Bloodstream Infection: 20-Year Trends from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, e00355-19 (2019).
165. M. Bonten, *et al.*, Epidemiology of Escherichia coli Bacteremia: A Systematic Literature Review. *Clin. Infect. Dis.* **72**, 1211–1219 (2020).
166. H. Miajlovic, M. M. Aogáin, C. J. Collins, T. R. Rogers, S. G. J. Smith, Characterization of Escherichia coli bloodstream isolates associated with mortality. *J. Méd. Microbiol.* **65**, 71–79 (2016).
167. J. R. Johnson, Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 80–128 (1991).
168. A. E. Barber, J. P. Norton, T. J. Wiles, M. A. Mulvey, Strengths and Limitations of Model Systems for the Study of Urinary Tract Infections and Related Pathologies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**, 351–367 (2016).

169. E. Barrios-Villa, L. R. Picón, R. B. Reynaga, M. M. de la P. Arenas-Hernández, Trending Topics in Escherichia coli Research, The Latin American Perspective. 249–276 (2023).
170. O. Clermont, *et al.*, Two levels of specialization in bacteraemic Escherichia coli strains revealed by their comparison with commensal strains. *Epidemiology Infect.* **145**, 872–882 (2017).
171. M. J. Struelens, *et al.*, Shigella Septicemia: Prevalence, Presentation, Risk Factors, and Outcome. *J. Infect. Dis.* **152**, 784–790 (1985).
172. J. M. van den Broek, *et al.*, Risk factors for mortality due to shigellosis: a case-control study among severely-malnourished children in Bangladesh. *J. Heal., Popul., Nutr.* **23**, 259–65 (2005).
173. J. A. Berkley, *et al.*, Bacteremia among Children Admitted to a Rural Hospital in Kenya. *N. Engl. J. Med.* **352**, 39–47 (2005).
174. M. Tobin-D’Angelo, *et al.*, Shigella Bacteremia, Georgia, USA, 2002–2012 - Volume 26, Number 1—January 2020 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerg. Infect. Dis.* **26**, 122–124 (2020).
175. H. Wisplinghoff, *et al.*, Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 309–317 (2004).
176. U. N. I.-A. G. for C. M. E. (UN IGME), “Levels and trends in child mortality.”
177. G. Morduchowicz, *et al.*, Shigella Bacteremia in Adults: A Report of Five Cases and Review of the Literature. *Arch. Intern. Med.* **147**, 2034–2037 (1987).
178. A. F. Hallett, J. N. Scragg, Shigella bacteraemia in Africans. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**, 673–674 (1978).
179. P. D. Mol, D. Brasseur, E. Schatteman, S. Kassam, Shigella and Shigellaemia. *Scand. J. Infect. Dis.* **13**, 75–77 (1981).
180. H. J. O’Connor, U. O’Callaghan, Fatal Shigella sonnei septicaemia in an adult complicated by marrow aplasia and intestinal perforation. *J. Infect.* **3**, 277–279 (1981).
181. B. Duncan, V. A. Fulginiti, O. F. Sieber, K. J. Ryan, Shigella Sepsis. *Am. J. Dis. Child.* **135**, 151–154 (1981).
182. R. M. Kligler, P. D. Hoepflich, Shigellemia. *West. J. Med.* **141**, 375–8 (1984).
183. M. J. Struelens, *et al.*, Shigella Septicemia: Prevalence, Presentation, Risk Factors, and Outcome. *J. Infect. Dis.* **152**, 784–790 (1985).

184. S. M. Qadri, S. H. Khalil, Polymicrobial septicemia due to *Shigella flexneri* and *Pseudomonas aeruginosa*: first report. *J. Natl. Méd. Assoc.* **79**, 1289–92 (1987).
185. J. Huebner, E. Gruner, A. von Graevenitz, W. Czerwenka, Shigellemia in AIDS patients: Case report and review of the literature. *Infection* **21**, 122–124 (1993).
186. K. Saraswathi, A. De, A. Jog, A. Gogate, *Shigella* septicemia. *Indian Pediatr.* **39**, 777–9 (2002).
187. J.-B. Yen, K.-W. Chang, T.-L. Wu, A.-J. Kuo, L.-H. Su, *Shigella flexneri* sepsis in an infant. *Chang Gung Méd. J.* **26**, 611–4 (2003).
188. D. Greenberg, S. Marcu, R. Melamed, M. Lifshitz, *Shigella* Bacteremia: A Retrospective Study. *Clin. Pediatr.* **42**, 411–415 (2003).
189. H. Chapel, A. Puel, H. von Bernuth, C. Picard, J.-L. Casanova, *Shigella sonnei* Meningitis Due to Interleukin-1 Receptor—Associated Kinase—4 Deficiency: First Association with a Primary Immune Deficiency. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 1227–1231 (2005).
190. S. A. Erqou, E. Teferra, A. Mulu, A. Kassu, A case of shigellosis with intractable septic shock and convulsions. *Jpn. J. Infect. Dis.* **60**, 314–6 (2007).
191. C. Hawkins, *et al.*, *Shigella sonnei* bacteremia: Two adult cases and review of the literature. *Scand. J. Infect. Dis.* **39**, 170–173 (2007).
192. N. E. C. G. Davies, A. S. Karstaedt, *Shigella* bacteraemia over a decade in Soweto, South Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **102**, 1269–1273 (2008).
193. C.-Y. Liu, Y.-T. Huang, C.-H. Liao, S.-C. Chang, P.-R. Hsueh, Rapidly Fatal Bacteremia Caused by *Shigella sonnei* without Preceding Gastrointestinal Symptoms in an Adult Patient with Lung Cancer. *Clin. Infect. Dis.* **48**, 1635–1636 (2009).
194. S. Sharma, A. Arora, *Shigella Flexneri* bacteremia in Adult. *J. Lab. Physicians* **4**, 065–066 (2012).
195. S. Jain, M. Sharma, R. Gupta, N. Shree, M. Kumar, Multidrug Resistant *Shigella Flexneri*: A Rare Case of Septicemia in an Infant. *J. Clin. Diagn. Res.* **8**, DD03-4 (2014).
196. S. B. Appannavar, *et al.*, Shigellemia in a post renal transplant patient: a case report and literature review. *J. Infect. Dev. Ctries.* **8**, 237–239 (2014).
197. O. Shogbesan, A. Rettew, B. Shaikh, A. Abdulkareem, A. Donato, *Shigella sonnei* Bacteremia Presenting with Profound Hepatic Dysfunction. *Case Rep. Gastrointest. Med.* **2017**, 7293281 (2017).
198. C. Nayyar, P. Thakur, V. Tak, A. Singh, *Shigella sonnei* Sepsis in an Infant: A Case Report. *J. Clin. Diagn. Res.* **11**, DD01–DD02 (2017).

199. M. Delgado, *et al.*, Bacteriemia por *Shigella flexneri* en dos lactantes. *Rev. Chil. infectologia* **35**, 317–320 (2018).
200. O. Carretero-Vicario, *et al.*, *Shigella sonnei* bacteraemia in a cystic fibrosis patient: case report and literature review. *Access Microbiol.* **2**, acmi000102 (2020).
201. H. E. Rotramel, H. S. Zamir, *Shigella* Bacteremia in an Immunocompetent Patient. *Cureus* **13**, e19778 (2021).
202. S. B. Appannanavar, *et al.*, Shigellemia in a post renal transplant patient: a case report and literature review. *J. Infect. Dev. Ctries.* **8**, 237–239 (2014).
203. A. Stefanovic, *et al.*, Multidrug-Resistant *Shigella sonnei* Bacteremia among Persons Experiencing Homelessness, Vancouver, British Columbia, Canada - Volume 29, Number 8—August 2023 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerg. Infect. Dis.* **29**, 1668–1671 (2023).
204. S. Elsen, *et al.*, A Type III Secretion Negative Clinical Strain of *Pseudomonas aeruginosa* Employs a Two-Partner Secreted Exolysin to Induce Hemorrhagic Pneumonia. *Cell Host Microbe* **15**, 164–176 (2014).
205. P. R. Dutta, R. Cappello, F. Navarro-García, J. P. Nataro, Functional Comparison of Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae. *Infect. Immun.* **70**, 7105–7113 (2002).