



HAL
open science

Enterococcus spp. : entre pathogènes opportunistes et probiotiques

Christophe Isnard

► **To cite this version:**

Christophe Isnard. Enterococcus spp. : entre pathogènes opportunistes et probiotiques. Microbiologie et Parasitologie. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMC408 . tel-01629315

HAL Id: tel-01629315

<https://theses.hal.science/tel-01629315v1>

Submitted on 6 Nov 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de Doctorat

Spécialité Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

« *Enterococcus* spp. : entre pathogènes opportunistes et probiotiques »

Présentée et soutenue par
Christophe ISNARD

Thèse soutenue publiquement le 06 Octobre 2017
devant le jury composé de

Pr. Martine PESTEL-CARON	Professeur des Universités, Université de Rouen	Examineur
Pr. Bruno FANTIN	Professeur des Universités, Université de Paris Diderot	Rapporteur
Dr. Damien ROUX	Maître de Conférences des Universités, HDR, Université de Paris Diderot	Rapporteur
Pr. Gérard LINA	Professeur des Universités, Université de Lyon 1	Examineur
Pr. Jean-Christophe GIARD	Professeur des Universités, Université de Caen Normandie	Examineur
Pr. Vincent CATTOIR	Professeur des Universités, Université de Rennes 1	Directeur de thèse

Thèse dirigée par le Pr. Vincent CATTOIR, Unité Inserm U1230 - UPRES EA2311
Université de Rennes 1



REMERCIEMENTS

Je souhaite en tout premier lieu exprimer ma très grande gratitude aux membres de mon jury, Madame le Professeur Martine Pestel-Caron, Messieurs les Professeurs Gérard Lina, Bruno Fantin, Jean Christophe Giard ainsi que Monsieur le Docteur Damien Roux qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et pour leur investissement dans l'évaluation de ce manuscrit.

Je souhaite également remercier chaleureusement « l'idole des jeunes », mon directeur de thèse Monsieur le Professeur Vincent « Johnny » Cattoir. Sans toi, je n'aurais surement jamais embrassé cette carrière hospitalo-universitaire que tu chéris tant. Ta passion est contagieuse. Merci pour ta très grande patience à mon égard, pour m'avoir fait partager ta grande rigueur intellectuelle, ton expertise scientifique et surtout ta gentillesse sans limite. Merci pour l'amitié que tu m'accordes.

J'ai une pensée pour le Monsieur le Pr. Leclercq sans qui tout ceci n'aurait jamais commencé. Merci Roland pour votre confiance et votre gentillesse. Vous êtes un exemple pour moi.

Je pense également souvent à toi Brigitte. Tout ce travail t'est évidemment dédié.

Je souhaite remercier également mes très chers collègues du service de microbiologie du CHU de CAEN qui m'ont toujours soutenu dans mon projet et qui ont eu la gentillesse et la courtoisie de modifier leurs plannings pour me laisser le plus de temps libre possible. Merci Michel, Marguerite, Claire et Julie, je vous dois énormément. Merci aussi à toute l'équipe technique qui me supporte depuis maintenant presque 8 ans. Vous êtes toutes et tous dans

mon cœur. Un grand merci à mon zouzou pour son implication quotidienne, week-end inclus. C'est toi le meilleur ! Merci enfin aux internes qui m'ont entouré pendant cette période et qui m'ont largement aidé dans la routine quotidienne et plus particulièrement François, Sophie et Emmanuelle. Je vous souhaite plein de belles choses pour vos avenir personnels mais aussi professionnels respectifs.

Une pensée particulière à mon partenaire de thèse, le Docteur François « speedy » Guérin. Nous avons partagé cette période de réussites et de galères ensemble et je ne te remercierai jamais assez pour les coups de main, ta gentillesse et ta constante envie de résoudre tous les problèmes.

Un grand merci à l'équipe « recherche » pour votre gentillesse, Anne, Mamadou, Sébastien, Domi et Pepito sans vous rien ne serait possible ou du moins tout serait bien plus compliqué, donc un grand merci à vous. Un merci particulier à la meilleure des secrétaires, Mme Julie Hoorelbeke. Merci pour ton implication dans toutes les tâches administratives, auprès de l'université, auprès des fournisseurs et j'en passe.

Merci également aux 2 meilleurs M2 du monde Claire Lallemand et Benoît Goudergues pour votre bonne humeur et les fous rires partagés.

Un grand merci aux copains caennais et aux expatriés de *San Ceri*. Marion, Fabi, Zaza, Roro, Clément, Marlène, Elo, François, Pritz et Zig. Sans vous je ne serai pas ce que je suis donc merci ! Une pensée également pour Emilie et Antoine qui m'ont accompagné ces derniers mois ! Merci les loustics. Une pensée également pour tous les amis tropéziens qui me manquent évidemment, les Floflos, les Gantois, Antho, Manon, Ju et Caro. Je vous embrasse tendrement.

Ce travail est le fruit de nombreuses collaborations donc merci à toute l'équipe du Dr. Felipe Cava de l'université d'Umea en Suède, merci au Dr. Didier Goux de la plateforme de

microscopie CMABio, à Mme le Professeur Laurence Zitvogel ainsi qu'à son équipe Unité INSERM U1015 de Villejuif et également à toute l'équipe de la société ViroScan3D et au Pr. Richard Bonnet (CHU de Clermont-Ferrand) pour sa participation à l'analyse génomique chez *E. hirae*.

Un merci à ceux sans qui je ne serais pas là. Maman, papa, ça y'est j'ai « presque » fini ! Les mots ne sont pas assez forts pour exprimer ce que je ressens. Merci pour tout ce que vous avez fait car je vous dois tout. Une très forte pensée à mon frère, qui a dû subir pendant des années mon stress et ma mauvaise humeur, je vous aime tous les trois. Malgré les sales coups de la vie, nous sommes unis et nous le resterons à jamais. *Ad usque fidelis*.

Enfin, mes pensées vont aux deux femmes qui m'épaulent, me supportent et surtout font rayonner mon cœur dès que je les vois. Véro et Lison, merci de partager ma vie, sans vous tout ceci n'aurait pas la même saveur et n'aurait sûrement pas existé. Je vous aime tellement.

TABLE DES MATIERES

ABBREVIATIONS UTILES	- 7 -
LISTE DES FIGURES	- 9 -
LISTE DES TABLEAUX	- 13 -
AVANT-PROPOS	- 15 -
I. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	- 19 -
1. Les bactéries du genre <i>Enterococcus</i>	- 20 -
1.1. Généralités.....	- 20 -
1.2. Rappels taxonomiques.....	- 22 -
1.3. Caractères biochimiques et culturels des bactéries du genre <i>Enterococcus</i>	- 24 -
2. Les entérocoques en pathologie humaine	- 26 -
2.1. Epidémiologie des infections à entérocoques.....	- 26 -
2.2. Place de <i>E. faecium</i> en pathologie humaine	- 28 -
2.3. <i>E. faecium</i> : un pathogène nosocomial émergent – Epidémiologie moléculaire	- 30 -
2.4. Passage de l'état commensal à opportuniste.....	- 34 -
3. <i>Enterococcus hirae</i>, « un modèle d'entérocoque »	- 37 -
3.1. <i>E. hirae</i> comme modèle pour l'étude de l'homéostasie du cuivre	- 37 -
4. Xénobiotiques antimicrobiens et résistance chez les entérocoques	- 41 -
4.1. Généralités.....	- 41 -
4.2. Résistance bactérienne aux antibiotiques	- 42 -
4.3. <i>E. faecium</i> et évolution de la résistance aux antibiotiques	- 47 -
4.4. La résistance aux β -lactamines chez les entérocoques	- 48 -
4.5. Résistance acquise aux aminosides	- 49 -
4.6. Résistance aux glycopeptides	- 50 -
4.7. Résistance au linézolide et à la daptomycine	- 54 -
4.8. Résistance aux antibiotiques de la classe des quinolones.....	- 56 -
4.9. Les macrolides-lincosamides-streptogramines et pleuromutilines (MLSP).....	- 58 -
4.10. Résistance aux tétracyclines et aux glycylicyclines	- 77 -
5. Les « ATP-Binding Cassette » protéines	- 81 -
5.1. Structure et fonctions des protéines ABC.....	- 82 -
5.2. Les protéines ABC de classe II ayant un rôle dans l'antibiorésistance	- 85 -
6. Impact des xénobiotiques non-antibiotiques sur la physiologie bactérienne	- 87 -
7. Cancer et Microbiote intestinal : un lien inattendu	- 92 -
7.1. Le microbiote intestinal.....	- 92 -
7.2. Microbiote et chimiothérapies anticancéreuses.....	- 94 -
II. OBJECTIFS DU TRAVAIL	- 99 -
III. RESULTATS ET DISCUSSION	- 103 -
1. Résistance aux antibiotiques chez <i>E. faecium</i>	- 104 -
1.1. Publication 1 : Etude de la résistance aux lincosamides, streptogramines A et pleuromutilines (phénotype LS _A P) chez <i>E. faecium</i>	- 104 -

1.2. Publication 2 : Etude génomique de la baisse de sensibilité à la Tigécycline chez <i>E. faecium</i>	119 -
2. Impact des xénobiotiques non-antibiotiques sur <i>E. faecium</i>	130 -
2.1. Publication 3 : Etude de l'impact des xénobiotiques <i>a priori</i> non-antibiotiques sur la physiologie de <i>E. faecium</i>	130 -
3. Rôle de <i>Enterococcus hirae</i> dans la réponse antitumorale médiée par le cyclophosphamide	187 -
3.1. Publication 4 : Rôle de <i>E. hirae</i> dans les effets immunologiques et anticancéreux induits par le cyclophosphamide : vers l'utilisation d' « oncobiotiques » ?.....	187 -
IV. CONCLUSIONS.....	235 -
V. PERSPECTIVES	243 -
1. Résistance et phénotype LS _A P	244 -
2. Résistance à la tigécycline	245 -
3. Impact des xénobiotiques non antibiotiques sur <i>E. faecium</i>	246 -
4. Utilisation de <i>E. hirae</i> comme oncobiotique.....	246 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	249 -
ANNEXES	291 -
1. Annexe 1. Communication affichée aux JRC 2013	292 -
2. Annexe 2. Communication affichée lors de l'ECCMID 2016 (Amsterdam)	293 -
RESUME / ABSTRACT	297 -

ABBREVIATIONS UTILES

AA : acide aminé

aa-ARNt : AminoAcyl-ARNt

ABC : *ATP-Binding Cassette*

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

AFPL : *Amplified Fragment-Length Polymorphism*

ARE : Antimicrobial Resistance Elements

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomal

ARNt : ARN de transfert

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

Aus0004 : *Enterococcus faecium* Aus0004

ATCC : American Type Culture Collection

CC17 : Complexe clonal CC17

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIP : Collection de l'Institut Pasteur

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNR : Centre National de Référence

CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

CTX: Cyclophosphamide

eat(A) : *Enterococcus* ABC Transporter

eat(A)_v: *Enterococcus* ABC Transporter variant

ECP : Electrophorèse en Champ Pulsé

ERG : Entérocoque Résistant aux Glycopeptides

ERV : Entérocoque Résistant à la Vancomycine

ERVE_{fm} : *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine

FC : Fold Change

FDA : *Food and Drug Agency*

GISA : Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus*

HM1070 : *Enterococcus faecium* HM1070

ICD : Infection à *Clostridium difficile*

IS : *Insertion Sequence*

KO: *Knock-Out*

LS_AP: Lincosamides-Streptogramines A-Pleuromutilines

L_{Th} : Lymphocytes T helpers

MALDI-Tof MS : *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry*

MATE: *Multidrug And Toxic compound Extrusion*

MDR : *Multi-Drug Resistance*

MFS : *Major Facilitator Superfamily*

MLS : Macrolides-Lincosamides-Streptogramines

MLS_B : Macrolides-Lincosamides-Streptogramines B

MLSP : Macrolides-Lincosamides-Streptogramines-Pleuromutilines

MLST : *MultiLocus Sequence Typing*

NGS : *Next-Generation Sequencing*

NBD : *Nucleotide-Binding Domain*

pb : paire de base

PLP : Protéine Liant les Pénicillines

PSDP : Pneumocoque de Sensibilité Diminuée à la Pénicilline

QRDR : *Quinolone Resistance-Determining Region*

RAPD : *Random Amplification of Polymorphic DNA*

RNA-seq : *RNA-sequencing*

RND : *Resistance-Nodulation-cell Division*

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline

SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*

SU 30S : Sous-Unité 30S

SU 50S : Sous-Unité 50S

ST : *Sequence Type*

TIG : Tigécycline

TMD : *TransMembrane Domain*

Tn : Transposon

UFC/g : Unités Formant Colonies par gramme

UFC/ml : Unités Formant Colonies par millilitre

USI : Unité de Soins Intensifs

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Evolution dans le temps des Eucaryotes (Van Tyne et Gilmore, 2014).....	- 20 -
Figure 2. Prévalence des souches de <i>E. faecium</i> résistantes à la vancomycine en Europe (2015) (http://atlas.ecdc.europa.eu).....	- 22 -
Figure 3. Arbre phylogénique du genre <i>Enterococcus</i> reposant sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. (Van Tyne et Gilmore, 2014).....	- 23 -
Figure 4. A) Aspect en microscopie optique (x 1000) de <i>E. faecium</i> après coloration de Gram. B) Aspect en microscopie électronique à balayage (x 1000) de <i>E. faecium</i> (photos personnelles).	- 24 -
Figure 5. Principales voies de transmission nosocomiales des entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (Arias et Murray, 2012).....	- 28 -
Figure 6. Proportions de souches d'ERV en Europe et en Amérique du Nord (adapté de Bourdon et al. 2010).....	- 32 -
Figure 7. Arbre phylogénétique basé sur l'occurrence de SNP sur le génome de 73 souches de <i>E. faecium</i> de diverses niches écologiques (Lebreton et al., 2013).....	- 34 -
Figure 8. Homéostasie du cuivre chez <i>E. hirae</i> (Solioz et al., 2010)..	- 39 -
Figure 9. Les différents mécanismes de résistance chez les bactéries du genre <i>Enterococcus</i> (Arias et Murray, 2012).	- 44 -
Figure 10. Evolution de l'antibiorésistance chez les entérocoques au cours des 40 dernières années (Cattoir et Leclercq, 2013).....	- 50 -
Figure 11. Représentation schématique de la biosynthèse du peptidoglycane (Cattoir et Leclercq, 2013).....	- 51 -
Figure 12. Classification des molécules appartenant à la classe des macrolides (Bryskier et al. 1993)	- 59 -

Figure 13. Structure chimique de la lincomycine et de son dérivé hémisynthétique, la clindamycine (Bryskier et al. 1993)	- 60 -
Figure 14. Structure chimique des streptogramines (Bryskier et Bergogne-Berezin, 1999).....	- 61 -
Figure 15. Structure chimique des pleuromutilines (Paukner et Riedl 2017)..	- 62 -
Figure 16. Composition du ribosome bactérien (www.oregonstate/edu).....	- 65 -
Figure 17. Structure secondaire de l'ARNr 23S (Nissen et al. 2000).....	- 66 -
Figure 18. Résumé schématique des différentes étapes de la traduction (Snyder et Champness, 2004)	- 68 -
Figure 19. Structure chimique et modifications conformationnelles des tétracyclines (Chopra et Roberts, 2001)	- 78 -
Figure 20. Organisation générale des protéines ABC et motifs conservés d'un domaine NBD (van Veen et Konings 1997)..	- 83 -
Figure 21. Représentation schématique et organisation d'un domaine liant les nucléotides (NBD) des protéines ABC (Davidson et al. 2008).....	- 84 -
Figure 22. Structure chimique des échinocandines, caspofungine, micafungine et anudulafungine (Georgopapadakou, 2001).....	- 90 -
Figure 23. Organisation de la membrane cellulaire et de la paroi fongique (Wiederhold et Lewis 2003).	- 91 -
Figure 24. Diversité microbienne et principaux phylums composant le microbiote intestinal (Dave et al. 2012).....	- 93 -
Figure 25. Rôle du microbiote intestinal dans l'activité anti-tumorale du cyclophosphamide (Vétizou et al. 2016)..	- 96 -

Figure 26. Comparaison des séquences protéiques des protéines *Eat(A)* et *Eat(A)v* avec d'autres protéines ABC « *Lsa-like* » impliquées dans la résistance aux MLSP : *Lsa(A)*, *Lsa(B)*, *Lsa(C)* et *Lsa(E)*.. - 106 -

Figure 27. Principe de la technique RNA-seq selon la technologie Illumina®. - 131 -

Figure 28. Influence de gavages itératifs d'OMB sur la croissance tumorale après traitement par CTX (Daillère et al. 2016). - 191 -

Figure 29. Représentation phylogénique des 5 souches étudiées en fonction de la présence/absence de protéines non conservées..... - 247 -

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1. Tableau récapitulatif des différentes familles d'antibiotiques utilisés en médecine humaine classées selon leur mécanisme d'action..</i>	- 41 -
<i>Tableau 2. Résistance de l'espèce E. faecium aux principales familles d'antibiotiques.....</i>	- 46 -
<i>Tableau 3. Récapitulatif des différents types de résistance aux glycopeptides chez les entérocoques (adapté de Cattoir et Leclercq, 2010).</i>	- 53 -
<i>Tableau 4. Concentrations Minimales inhibitrices des différentes souches utilisées dans l'étude.....</i>	- 108 -
<i>Tableau 5. SNP retrouvés au sein du génome de AusTig par comparaison avec le génome de la souche parentale Aus0004.</i>	- 120 -

AVANT-PROPOS

Depuis des dizaines d'années, le positionnement entre commensaux et pathogènes de certaines espèces bactériennes est de plus en plus difficile à définir. Cette question est particulièrement posée dans de nombreuses études durant la dernière décennie du fait de l'apparition de très nombreuses techniques moléculaires permettant d'analyser des ensembles bactériens comme les microbiotes. Les bactéries sont connues pour être essentielles à l'équilibre physiologique des êtres vivants pluricellulaires et participent également au développement direct ou indirect de leur immunité naturelle. Cette notion de stimulation du système immunitaire de l'hôte est à la base des théories probiotiques et une espèce d'entérocoques en particulier, *Enterococcus hirae*, semble jouer un rôle dans la promotion de l'immunité anti-tumorale (Zitvogel *et al.* 2017; Daillère *et al.* 2016; Vétizou *et al.* 2015; Viaud *et al.* 2013). Cependant, bon nombre de bactéries sont responsables d'une morbi-mortalité non négligeable en particulier chez les patients hospitalisés. Chez ces patients et plus particulièrement chez ceux hospitalisés au sein de services de réanimation, un petit groupe de 6 bactéries est responsable d'environ 80% des infections liées aux soins et est appelé « ESKAPE » pour *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter* spp. (Pendleton *et al.* 2013). Dans ce groupe *E. faecium*, bactérie qui au demeurant est beaucoup moins virulente que d'autres espèces à Gram positif comme *S. aureus* ou *Streptococcus pyogenes*, est responsable de plus de 5% des infections liées aux soins dans le monde. L'explication se trouve sûrement dans la capacité que possède cette bactérie à s'adapter et à résister à une pléiade de contraintes environnementales comme par exemple l'adhésion à la cellule hôte, l'échappement à une réponse immunitaire mais aussi l'adaptation physiologique aux molécules xénobiotiques rencontrées au sein de l'hôte. En plus de ses capacités d'adaptation environnementales, certaines espèces d'entérocoques, notamment *E. faecium*, sont douées d'une multi-résistance

aux antibiotiques. Cette notion de résistance pose un problème majeur du fait d'un nombre d'alternatives thérapeutiques de plus en plus réduit et présente une attention toute particulière dans les plus hautes instances décisionnaires tant sur le plan national qu'international. De plus, généralement, ces souches dites multi-résistantes sont responsables le plus souvent d'infections nosocomiales et participe à l'émergence d'épidémies mondiales par expansion clonale. C'est tout particulièrement le cas des entérocoques résistants à la vancomycine (ERV), antibiotique de la famille des glycopeptides dont le spectre d'action s'articule autour des bactéries à Gram positif, qui représentent un problème de santé publique majeur du fait de la *quasi* impasse thérapeutique induite par leur phénotype de multi-résistance mais aussi par le risque de transfert de la résistance à la vancomycine à d'autres espèces plus virulentes comme *S. aureus*.

Depuis trois décennies, de nombreux chercheurs se sont penchés sur la résistance aux antibiotiques, en particulier chez *E. faecium* du fait du caractère épidémique et nosocomial de cette espèce. Cependant, avec l'utilisation de nouvelles molécules, certains caractères moléculaires de la résistance aux antibiotiques restent encore méconnus. De plus, depuis une dizaine d'années et l'avènement de nouvelles technologies moléculaires comme le séquençage à haut débit (ou next-generation sequencing [NGS]) ou la transcriptomique, l'étude de l'impact des microbiotes sur l'hôte mais aussi des xénobiotiques sur la bactérie, ont permis d'établir de nouvelles voies de recherche fondamentale et en particulier l'endocrinologie bactérienne et l'immuno-bactériologie (Lyte, 2004). L'objectif de ce travail a été 1) d'étudier la mécanistique de la résistance à deux antibiotiques utilisés dans le traitement des infections à *E. faecium* multi-résistant aux antibiotiques (quinupristine-dalfopristine et tigécycline) ; 2) déterminer l'impact des molécules *a priori* non-antibiotiques les plus utilisées en réanimation médicale sur *E. faecium* et 3) de participer à un travail sur l'utilisation comme oncobiotique de *E. hirae*.

La première partie de ce manuscrit sera consacrée à une revue de la littérature portant sur les entérocoques comme bactéries environnementales et opportunistes, les différents mécanismes de résistances aux antibiotiques, l'étude de l'impact des molécules non-antibiotiques utilisées en médecine sur différentes espèces bactériennes et enfin le rôle du microbiote dans la réponse anticancéreuse.

La seconde partie du mémoire regroupera les publications qui illustrent les résultats obtenus lors de ce travail de thèse ainsi qu'une discussion de synthèse concernant l'ensemble des travaux et des perspectives qui peuvent en découler.

I. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les bactéries du genre *Enterococcus*

1.1. Généralités

Les entérocoques sont des bactéries à Gram positif, non sporulées qui se présentent sous forme de coques isolés ou arrangés en paires ou en chaînettes et dont le génome contient un faible pourcentage en G+C (37,5 à 44 %). Les entérocoques sont des bactéries ubiquistes, présentes dans différentes niches écologiques telles que le tractus intestinal des mammifères dont l'homme, plus rarement au niveau du vagin ou de la cavité buccale (Schloissnig *et al.* 2013; Beargie *et al.* 1975). Ils sont également retrouvés chez d'autres espèces animales dont les reptiles, les oiseaux et même les insectes (Gilmore *et al.* 2013; Flahaut *et al.* 1997; Deibel *et al.* 1963; Mundt *et al.*, 1962). Leur présence a même été démontrée chez certaines espèces animales préhistoriques auxquelles ils ont su s'adapter en évoluant avec les habitudes de vie au long des âges (Lebreton *et al.* 2017; Van Tyne et Gilmore 2014) (Figure 1). On les retrouve également dans les eaux usées, l'eau douce, l'eau de mer et le sol.

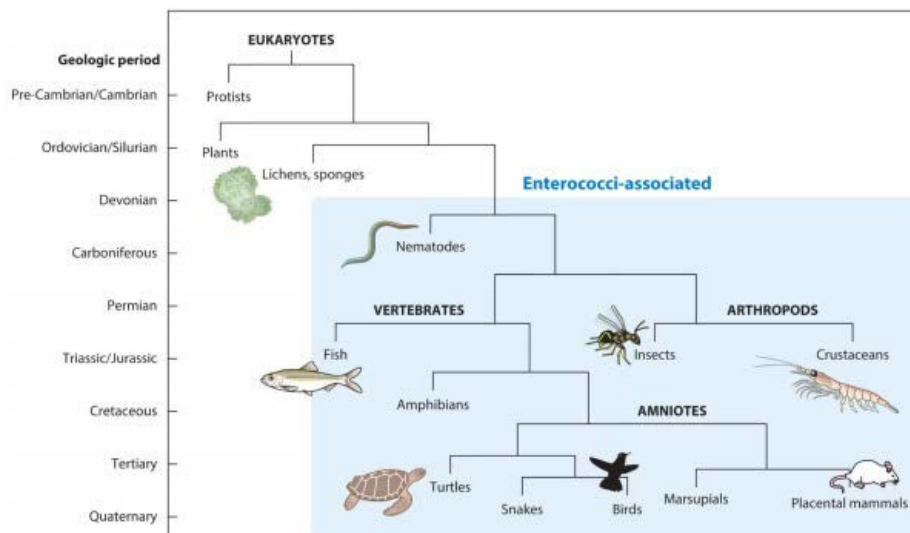


Figure 1. Evolution dans le temps des Eucaryotes (Van Tyne et Gilmore, 2014).

Le rectangle bleu correspond aux espèces chez lesquelles le portage intestinal d'entérocoques est avéré.

L'échelle des ordonnées correspond aux ères géologiques.

La présence d'entérocoques peut-être détectée dans de nombreux produits alimentaires à usage humain comme le fromage ou les produits fermentés. Du fait de leur résistance aux températures de pasteurisation et leur grande adaptabilité aux conditions environnementales, ils sont retrouvés à la fois dans les produits crus mais aussi dans les produits finis issues de l'industrie agro-alimentaire (Foulquié Moreno *et al.* 2006). Ces germes sont communément utilisés comme indicateur de contamination d'origine fécale afin de tester la qualité hygiénique des échantillons environnementaux (eaux utilisées pour la consommation) mais aussi alimentaires (Wheeler *et al.* 2002). Ces bactéries sont également utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et rentrent dans la composition de certains probiotiques du fait de la production de bactériocines par certaines espèces (Celiberto *et al.* 2017; Franz *et al.* 1999).

L'utilisation comme probiotiques à usage humain d'espèces responsables d'infections cliniques comme *E. faecalis* et *E. faecium* reste limitée mais *E. faecalis* est largement utilisé comme complément alimentaire pour animaux et *E. faecium* rentre dans la composition de probiotiques alimentaires qui sembleraient efficaces dans la prévention de diarrhées associées à la prise d'antibiotiques mais aussi dans le traitement de diarrhées infantiles (Canani *et al.* 2007; Wunderlich *et al.* 1989). Certaines espèces d'entérocoques, et en particulier *Enterococcus hirae*, sembleraient pouvoir être utilisées comme oncobiotiques. En effet, comme démontré plus loin dans ce mémoire, une étude à récemment montré que l'adjonction d'une souche particulière d'*E. hirae* dans le régime alimentaire de souris porteuses de tumeurs permettait une diminution significative de la taille des tumeurs lorsque ces dernières étaient traitées par un agent alkylant classiquement utilisé en thérapeutique anticancéreuse, le cyclophosphamide (Daillère *et al.* 2016).

Cependant, l'utilisation des entérocoques dans l'alimentation reste très controversée du fait du nombre de plus en plus important de cas d'infections humaines à entérocoques, et

plus particulièrement à entérocoques résistants à la vancomycine (ERV), avec des prévalences très importantes aux États-Unis (environ 80% des souches d'*E. faecium* isolées à l'hôpital), dans certains pays anglo-saxons (ex. Irlande) et des Balkans (Figure 2). Ces données ont donc soulevé de nombreuses inquiétudes concernant leur utilisation dans l'industrie agro-alimentaire (Franz *et al.* 2003).

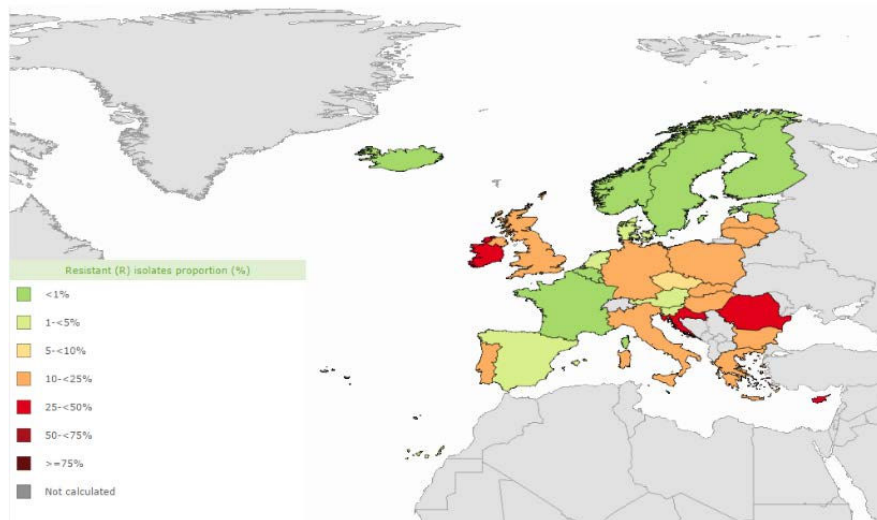


Figure 2. Prévalence des souches de *E. faecium* résistantes à la vancomycine en Europe (2015)

(<http://atlas.ecdc.europa.eu>)

1.2. Rappels taxonomiques

Les entérocoques sont des organismes anaérobies aérotolestants, oxydase et catalase négatives. Ils ont une température de croissance optimale de 35°C, bien que la plupart des espèces de ce genre puissent croître à des températures allant de 10 à 45°C. Ils peuvent aussi croître en présence de 6,5 % de NaCl, à pH 9,6 et ils survivent à un traitement de 60°C pendant 30 minutes. Enfin, les entérocoques appartiennent, pour la plupart, au groupe sérologique D de la classification de Lancefield (Lancefield 1933).

Initialement décrits par Thiercelin et classés comme des streptocoques fécaux en 1906 (*Streptococcus faecalis*) et 1919 (*Streptococcus faecium*) (Murray 1990), il a fallu attendre 1984 et des expériences d'hybridation ADN-ADN ainsi que l'analyse des séquences de l'ARNr 16S et de *sodA* pour montrer que les espèces *S. faecium* et *S. faecalis* étaient suffisamment distinctes des autres streptocoques pour justifier la création du genre *Enterococcus* (Schleifer *et al.* 1984).

La phylogénie de ce genre ne cesse d'évoluer du fait de l'avènement de nouvelles technologies permettant une évolution quasi-constante de la taxonomie. En effet, initialement composé des deux espèces précédemment citées, le genre *Enterococcus* comptait 37 espèces en 2011, 48 espèces en 2013 (Figure 3) et 55 espèces en 2017 (Euzéby 2008).

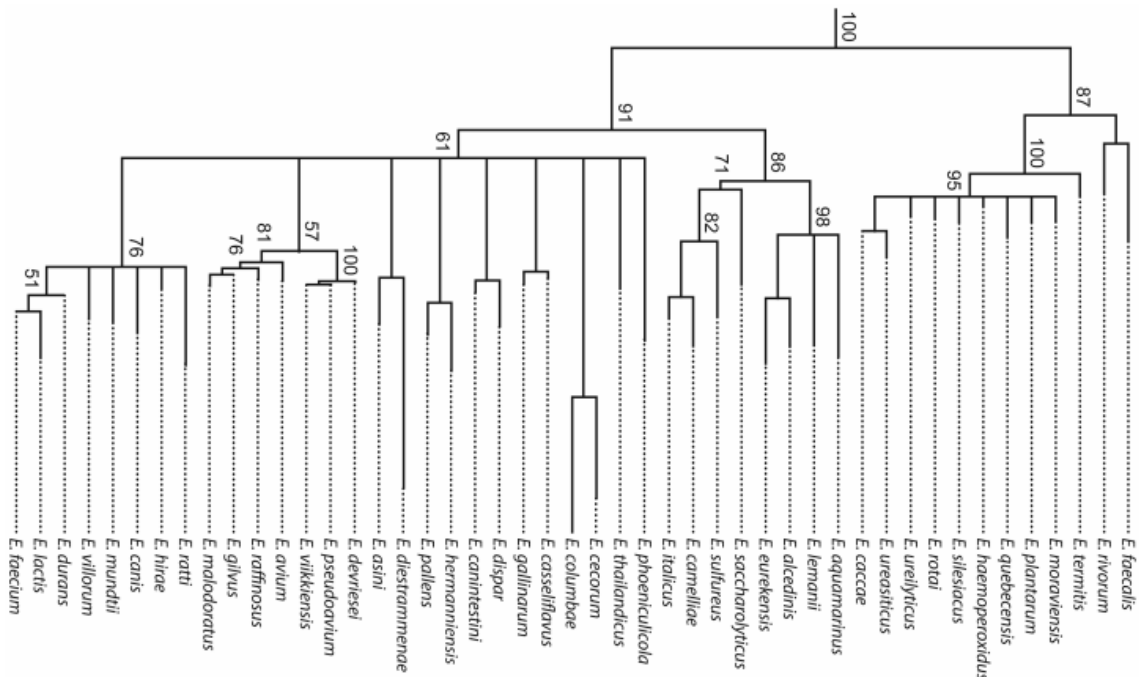


Figure 3. Arbre phylogénique du genre *Enterococcus* reposant sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. (Van Tyne et Gilmore, 2014)

1.3. Caractères biochimiques et cultureux des bactéries du genre *Enterococcus*

Les entérocoques se distinguent des autres streptocoques par leur capacité à se multiplier malgré des conditions de croissance hostiles comme des températures extrêmes (10°C à 45°C), en milieu hypersalé, en présence de 40% bile ou encore à pH alcalin. De plus, les bactéries du genre *Enterococcus* hydrolysent l'esculine.

Les entérocoques sont des cocci à Gram positif immobiles (sauf *E. casseliflavus* et *E. gallinarum* qui sont mobiles à 30°C), non capsulés, disposés en paires ou en courtes chaînettes. Les bactéries peuvent prendre un aspect coco-bacillaire quand la coloration de Gram est effectuée à partir de colonies sur gélose (Figure 4A et 4B).

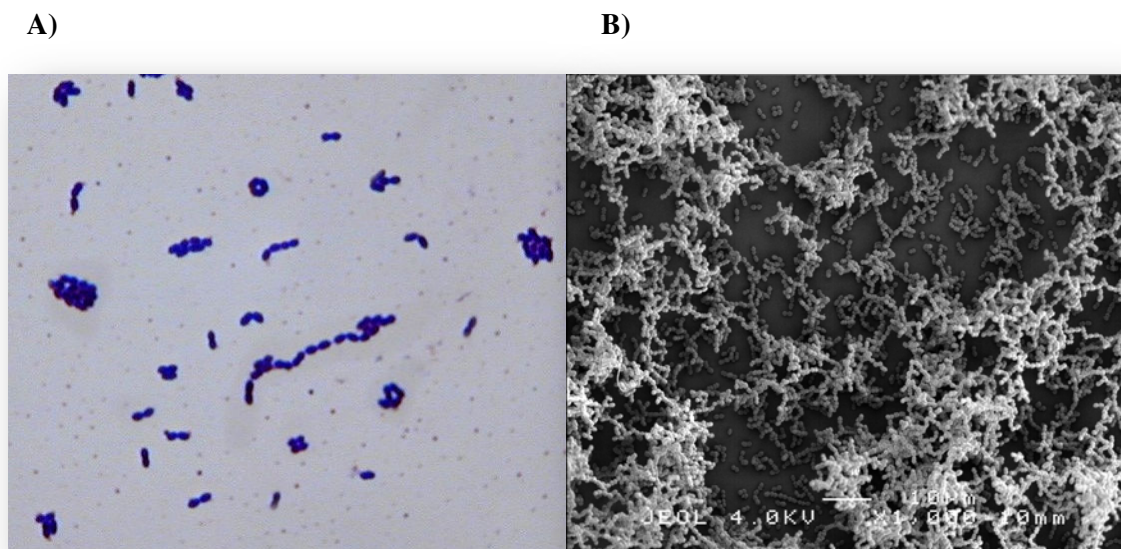


Figure 4A) Aspect en microscopie optique (x 1000) de *E. faecium* après coloration de Gram. B) Aspect en microscopie électronique à balayage (x 1000) de *E. faecium* (photos personnelles).

Les bactéries du genre *Enterococcus* sont peu exigeantes en facteurs de croissance et peuvent donc se multiplier aisément sur les géloses ordinaires Trypticase-Soja (TS) après 18 à 24 heures d'incubation à 35°C. Les colonies d'entérocoques apparaissent alors translucides (sauf *E. casseliflavus* qui présentent une légère pigmentation jaune) avec un diamètre inférieur

à 1 mm. La croissance peut se faire sous toutes les conditions respiratoires (anaérobie, aérobie et aérobie avec adjonction de 5% de CO₂). Certaines souches de *Enterococcus faecalis* sont β -hémolytiques sur géloses au sang (*E. faecalis* var. *zymogenes*), alors que les autres espèces d'entérocoques sont généralement α -hémolytiques ou non hémolytiques.

Ces caractéristiques biochimiques et en particulier la dégradation de certains sucres ont permis la mise au point en bactériologie clinique de milieux « sélectifs » pour les entérocoques (milieux dits bile-esculine) mais aussi de dépistage rapide par méthode chromogène, intéressants dans un contexte d'épidémie à ERV. Enfin l'identification des entérocoques est aisée par la technique de spectrométrie de masse de type de MALDI-TOF ou par certaines techniques moléculaires comme le séquençage du gène *sodA* ou codant pour l'ARNr 16S (Benagli *et al.* 2011; Fenselau et Demirev 2001; Poyart *et al.* 1995).

2. Les entérocoques en pathologie humaine

Le corps humain héberge environ 10^{14} de bactéries, qui colonisent la bouche, l'arbre respiratoire, le tractus gastro-intestinal et l'appareil uro-génital, on parle alors de microbiotes. La plupart des bactéries des différents microbiotes sont symbiotiques c'est-à-dire qu'elles présentent une innocuité dans les conditions physiologiques et sont utiles au bon fonctionnement de l'hôte qu'elles colonisent. Le bon déroulement de cette symbiose dépend de la capacité de notre organisme à maintenir et contrôler l'équilibre de cette flore microbienne, on parle alors de bactéries commensales. Cependant, une partie de la microflore digestive est opportuniste et peut être à l'origine d'infection si la barrière digestive est franchie ou à l'occasion d'une immunodépression. Les bactéries comme les entérocoques, faisant parties du microbiote intestinal, peuvent alors se multiplier dans des sites normalement stériles, provoquant ainsi une infection.

2.1. Epidémiologie des infections à entérocoques

Les infections à entérocoques en pathologie humaine sont principalement dues à deux espèces, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium*, qui représentent 95% des isolats cliniques de ce genre bactérien (Arias et Murray 2012; Jones *et al.* 1997). D'autres espèces mineures peuvent causer des infections chez l'homme comme *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. hirae* ou *E. raffinosus* (Jolivet *et al.* 2016; Gordon *et al.* 1992).

Les premières infections à *E. faecalis* ont été décrites simultanément en 1899 par Thiercelin et MacCallum *et* Hastings. Aux Etats-Unis, les entérocoques représentent le troisième genre bactérien isolé lors de bactériémies (Richard et Chandy 1999; Vincent *et al.* 2009) et la seconde cause d'infections associées au cathétérisme (sanguin ou urinaire) et

d'infections de la peau et des tissus mous (Arias et Murray 2012). C'est également le genre le plus souvent cité lors d'infections de plaies chirurgicales dans les unités de soins intensifs (Murray 1990). L'augmentation croissante des infections nosocomiales à entérocoques aux Etats-Unis se répartie en 2 périodes distinctes. Tout d'abord dès les années 1970-1980 et l'augmentation de l'utilisation des céphalosporines de 3^{ème} génération, antibiotiques inactifs sur ces germes, où 95% des isolats d'entérocoques étaient des souches de *E. faecalis*. Puis depuis le début des années 90, la deuxième vague d'infections avec cette fois préférentiellement des isolats de *E. faecium*. Cette augmentation des isolats de *E. faecium* est corrélée avec l'utilisation massive de la vancomycine et des antibiothérapies à large spectre, le plus souvent inactives sur ces bactéries (Arias and Murray 2012). Cette problématique localisée aux Etats-Unis dans les années 1990, semble désormais s'étendre au niveau mondial (Willems et van Schaik 2009). Les infections à entérocoques peuvent atteindre divers sites, notamment intra-abdominaux (cholécystites, péritonites en association avec les entérobactéries et anaérobies), les voies urinaires, les plaies chirurgicales ou les valves cardiaques (endocardites) et sont aussi responsables d'infections sur matériel (cathéters vasculaires ou biliaires, sondes urinaires, prothèses ostéo-articulaires ou valvulaires) (Magill *et al.* 2014; Jones *et al.* 1997). Les facteurs de risques de développer une infection à entérocoques ont été largement analysés et incluent une hospitalisation supérieure à 15 jours, l'administration prolongée d'antibiotiques ou l'existence d'une pathologie sous-jacente comme le diabète (Magill *et al.* 2014; Arias et Murray 2012). Le plus souvent une procédure invasive à visée diagnostique ou thérapeutique comme le sondage urinaire ou les explorations endoscopiques est l'élément responsable de l'apparition d'une bactériémie (Arias et Murray 2012; Jones *et al.* 1997) (Figure 5). Les bactéries qui survivent alors dans le flux sanguin du patient peuvent également se fixer sur les valves cardiaques à la faveur d'une cardiopathie préexistante. En effet, les entérocoques représentent 10% à 15% des micro-organismes

responsables d'endocardites infectieuses dans le monde. Ces endocardites sont généralement d'évolution subaiguë avec une mortalité importante avoisinant les 20% (Murdoch *et al.* 2009).

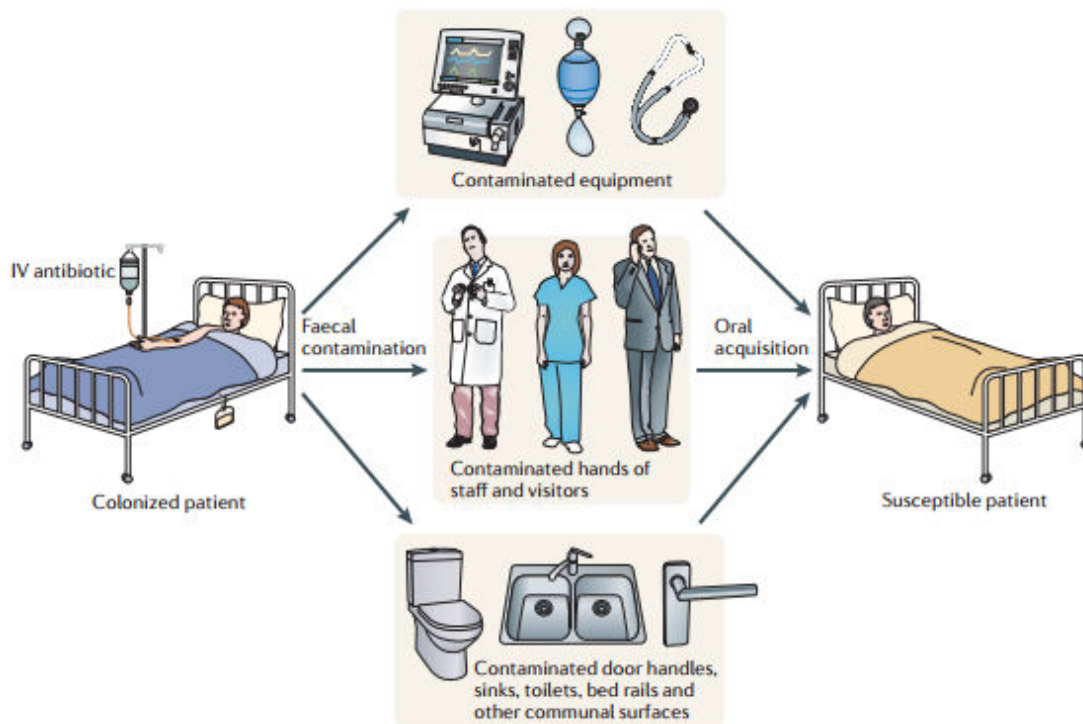


Figure 5. Principales voies de transmission nosocomiales des entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (Arias et Murray, 2012)

2.2. Place de *E. faecium* en pathologie humaine

Depuis une vingtaine d'années, les entérocoques émergent comme étant des pathogènes nosocomiaux ou liés aux soins (Arias et Murray 2012). Deux espèces sont responsables de la très grande majorité des infections, il s'agit de *E. faecalis* (80 % des infections à entérocoques) et *E. faecium* (environ 10-20 % des infections à entérocoques). Il apparaît que les entérocoques représentent environ 1% du microbiote digestif chez l'homme et semblent particulièrement coloniser l'iléon, le jéjunum et peuvent être retrouvés dans les

selles à des concentrations importantes, de l'ordre de 10^6 UFC/g (Hayashi *et al.* 2005; Jett *et al.*, 1994).

E. faecalis est l'espèce la plus représentée dans la flore gastro-intestinale de l'être humain et présente une virulence et une pathogénicité largement plus importante que les autres espèces d'entérocoques (Kayaoglu et Ørstavik 2004; Tannock 2002; Jett *et al.* 1994). *E. faecium* est l'espèce qui se distingue des autres espèces d'entérocoques par sa grande résistance aux antibiotiques. En effet, il a été démontré par différentes études qu'à la fin des années 90, environ 2% des souches de *E. faecalis* étaient résistantes à la vancomycine alors que 80% des souches de *E. faecium* étaient résistantes à l'ampicilline et 50% résistantes à la vancomycine (Van Tyne et Gilmore 2014; Huycke *et al.*, 1998), alors qu'en Europe les infections à *E. faecium* résistants à l'ampicilline passait de 2% dans le milieu des années 90 à 35% au milieu des années 2000 et jusqu'à 70% dans certaines études (Sánchez-Díaz *et al.* 2016; Top *et al.* 2008; Top *et al.* 2007). Du fait de sa grande résistance aux antibiotiques et de son adaptabilité accrue au milieu hospitalier, *E. faecium* émerge depuis une vingtaine d'années et présente un taux d'infections qui tend vers celui de *E. faecalis*, particulièrement aux Etats-Unis (Guzman Prieto *et al.* 2016; Pendleton *et al.* 2013; Arias et Murray 2012). Son rôle en pathologie humaine est clairement établi désormais puisque une étude prospective menée en 2009 et portant sur la prévalence des infections dans les services de réanimations de 75 pays dans le monde à un jour donné (1265 services de réanimations / soins intensifs inclus) a permis de mettre en évidence que les entérocoques étaient bien représentés avec environ 10% des infections mais aussi que *E. faecium* jouait un rôle prédominant avec environ 4% des infections dues à une souche ERV (Vincent *et al.* 2009). Cette prévalence importante sous-entend une dissémination mondiale de souches d'ERV adaptées au milieu hospitalier. Il a été démontré qu'il existait bien un clone particulier chez *E. faecium* particulièrement résistant aux antibiotiques et parfaitement adapté aux contraintes hospitalières. Ces souches

appartiennent au complexe clonal 17 ou CC17 (Guzman Prieto et al. 2016; Lebreton et al. 2013; K. L. Palmer et al. 2012). Les premières souches de *E. faecium* résistantes à haut niveau à l'ampicilline ont été observées dès la fin des années 1980 (Grayson *et al.* 1991; Sapico *et al.* 1989) et depuis le milieu des années 80, l'apparition et l'émergence de souche d'ERV (Roland Leclercq et al. 1988; Uttley et al. 1988). De plus, plusieurs cas de résistances aux antibiotiques utilisés dans le traitement des infections à ERV comme le linezolide, la daptomycine, la tigécycline mais aussi la quinupristine-dalfopristine ont déjà été rapportés (Cattoir *et al.* 2015; Arias *et al.* 2011; Montero *et al.* 2004; Prystowsky *et al.* 2001; Fantin *et al.* 1997). Cette explosion de l'antibiorésistance chez *E. faecium* s'explique par l'absence au sein de son génome de système CRISPR-*cas*, connu pour être un système de défense chez les procaryotes permettant l'apparition d'une immunité acquise chez la bactérie (Horvath et Barrangou 2010; Marraffini et Sontheimer 2010). En effet, il a été démontré qu'un tel système était retrouvé chez *E. faecalis* et lui permettrait de limiter l'acquisition d'éléments génétiques mobiles, principaux vecteurs de gènes de résistance aux antibiotiques (Palmer et Gilmore 2010; Bourgogne *et al.* 2008). La résistance intrinsèque des entérocoques à certains antibiotiques comme les aminosides et leur possibilité d'échanger certains déterminants de résistance comme ceux impliqués dans la résistance à la vancomycine, explique partiellement l'émergence de ces germes au niveau nosocomial. La plasticité du génome des entérocoques leur permet de rapidement s'adapter aux contraintes environnementales en acquérant des gènes leur permettant d'augmenter leur capacité de colonisation mais aussi d'infection des hôtes (Van Tyne et Gilmore 2014; Lebreton *et al.* 2013).

2.3. *E. faecium* : un pathogène nosocomial émergent – Epidémiologie moléculaire

L'apparition et l'émergence des infections à *E. faecium* résistants à la vancomycine (ERVEfm) dès les années 90 aux Etats-Unis, ont permis une augmentation importante du nombre d'études concernant ces germes et en particulier, les études d'épidémiologie moléculaire. De très nombreuses études sur les ERV hospitaliers aux Etats-Unis, utilisant la technique de l'électrophorèse en champ pulsé (ECP), ont en effet très tôt mis en évidence l'existence d'une dissémination de type clonale d'un petit nombre de souches (Goossens 1998). Ces études ont permis de démontrer que les ERVEfm se transmettaient de façon croisée (Hayden 2000). Ces premières épidémies étaient causées par un ou deux clones circulants d'ERVEfm mais ont rapidement évolué sur un mode polyclonal avec la circulation de nombreux clones aux Etats-Unis (Bonten *et al.* 1996). Cette endémicité polyclonale serait sûrement assurée par des transferts horizontaux d'informations génétiques et de déterminants de résistance (Cattoir et Leclercq 2013; Arias et Murray 2012; Werner *et al.* 2003; Kawalec *et al.* 2001; Suppola *et al.* 1999) liés à l'utilisation importante d'antibiotiques en médecine vétérinaire comme par exemple l'avoparcine (antibiotique de la famille des glycopeptides) en Europe (Cattoir et Leclercq 2013; Bonten *et al.* 2001).

De façon intéressante, la plupart des souches de *E. faecium* responsables d'infections nosocomiales aux Etats-Unis sont résistantes à l'ampicilline mais aussi à la vancomycine alors que les souches clonales européennes responsables d'infections nosocomiales sont le plus souvent sensibles à la vancomycine mais restent tout de même résistantes de haut niveau à l'ampicilline (Cattoir et Leclercq 2013) (Figure 6).

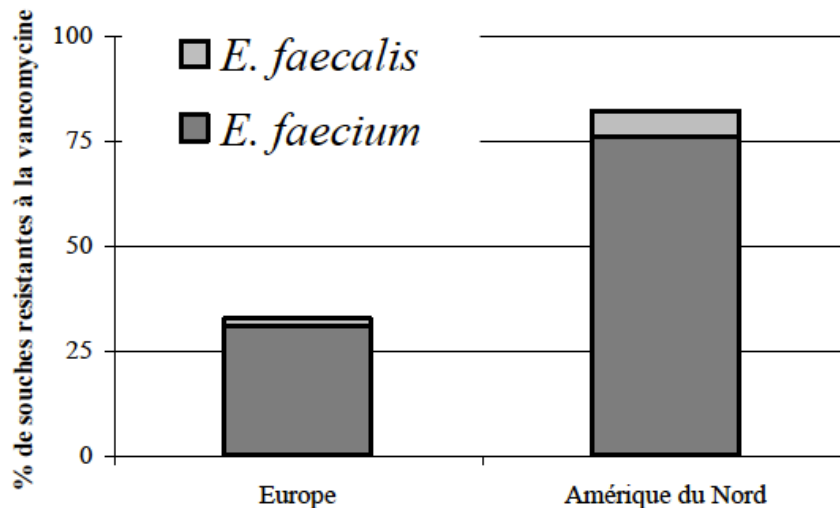


Figure 6. Proportions de souches d'ERV en Europe et en Amérique du Nord (adapté de Bourdon et al. 2010).

En France, la prévalence des ERV est restée relativement faible au cours des dernières décennies du fait d'une politique d'utilisation des antibiotiques assez drastique tant en médecine humaine que vétérinaire (Bourdon *et al.* 2011). L'évolution épidémique mondiale de clones hospitaliers multirésistants de *E. faecium* depuis une vingtaine d'années, couplée au remplacement partiel de *E. faecalis* par *E. faecium* comme cause d'infections à entérocoques, démontre des changements importants d'un point de vue génétique au sein de cette espèce. Cette notion d'évolution a été récemment mise en évidence par l'utilisation de nouvelles techniques de typage moléculaire (Coque *et al.* 2005) comme la *Multilocus sequence typing* (MLST) la *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) ou la technique dite *amplified fragment-length polymorphism* (AFLP). Par l'utilisation de la MLST, il a été démontré l'existence d'un groupe de clones de *E. faecium* isolés en milieu hospitalier. Ce groupe clonal appelé « *clonal complex CC17* » (CC17) est particulièrement adapté au milieu hospitalier et présente des marqueurs phénotypiques et génotypiques particuliers comme la résistance de haut niveau à l'ampicilline et aux fluoroquinolones et la présence de gènes de virulence comme *esp* et *hyl* (Willems et Bonten 2007; Willems *et al.* 2005). Il est toutefois

important de noter que toutes les souches appartenant au CC17 ne sont pas forcément résistantes à la vancomycine (Willems *et al.* 2005). Ces souches CC17 incluent des souches appartenant aux « *sequence types* » (ST) hospitaliers ST17, ST117 et ST118. L'émergence de ces souches CC17 découlerait de l'évolution d'une sous-population de souches particulièrement adaptées aux contraintes environnementales du milieu hospitalier grâce à une propension importante à acquérir des éléments génétiques mobiles comme des séquences d'insertion et donc une grande plasticité génomique. En effet, il a été démontré que ces souches CC17 possèdent la séquence d'insertion *IS16* permettant leur dépistage rapide par méthode moléculaire (Leavis *et al.* 2007). Plusieurs travaux ont pu montrer que les souches communautaires, responsables d'infections hospitalières mais aussi environnementales et animales, se regroupaient dans différents clades, nommés clade A et clade B, phylogénétiquement très différents (Galloway-Peña *et al.* 2012; K. L. Palmer *et al.* 2012). De plus, une étude récente utilisant la détection de SNP (*single nucleotide polymorphism*) à partir des génomes de 73 souches de *E. faecium* provenant de diverses niches écologiques et de divers profils MLST (portage fécal communautaire, portage fécal hospitalier, souches responsables d'infections hospitalières, souches animales et autres) a démontré que les souches hospitalières à fort potentiel infectieux, parmi lesquelles les souches appartenant au CC17, dérivait de souches animales et de portage d'animaux de compagnie comme décrit précédemment (Figure 7) (Lebreton *et al.* 2013; de Regt *et al.* 2012).

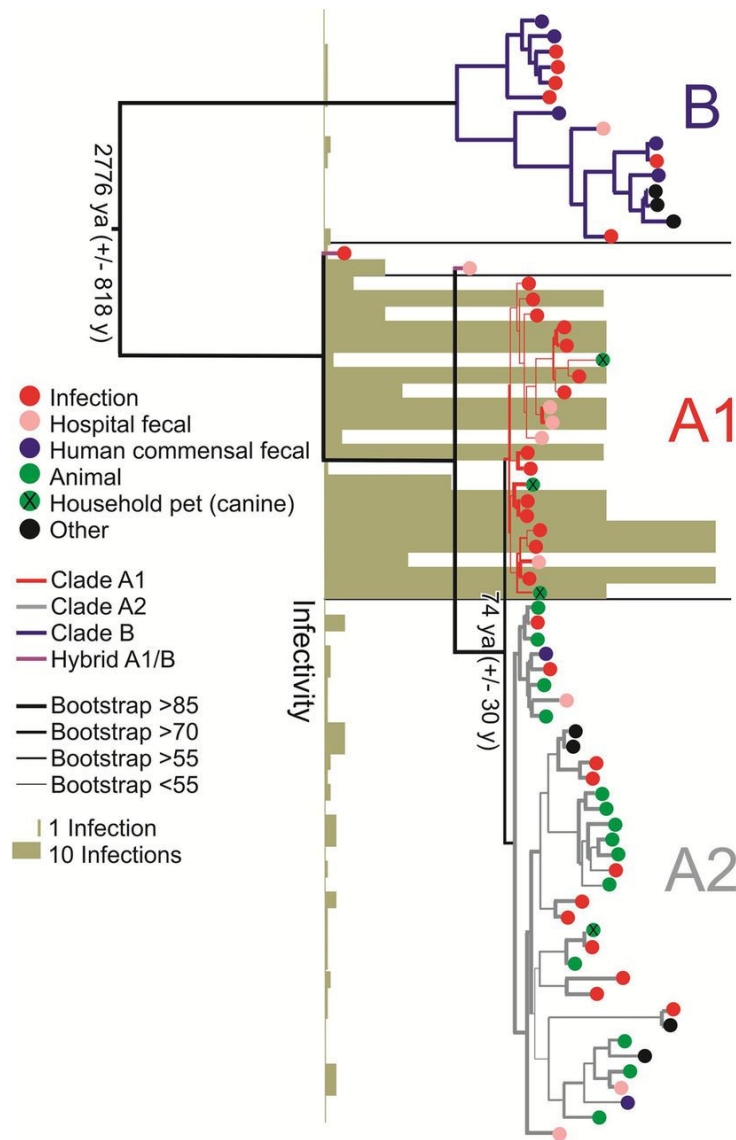


Figure 7. Arbre phylogénétique basé sur l'occurrence de SNP sur le génome de 73 souches de *E. faecium* de diverses niches écologiques (Lebreton et al., 2013).

2.4. Passage de l'état commensal à opportuniste

Les entérocoques sont des bactéries commensales faisant partie intégrante du microbiote intestinal humain, qui ont la faculté (en particulier *E. faecalis* et *E. faecium*) de traverser la barrière intestinale, de survivre au sein des cellules du système immunitaire, comme les macrophages, mais aussi d'adhérer aux cellules épithéliales (Arias et Murray 2012). Lors de l'apparition d'une dysbiose ou d'une perturbation de l'équilibre entre hôte et

bactérie, ils peuvent devenir pathogènes en gagnant des sites anatomiques extra-intestinaux, provoquant ainsi des infections. Les situations de dysbiose peuvent apparaître en cas de déficit immunitaire de l'hôte, de contact avec des xénobiotiques mais aussi lors de certaines pathologies ou traitements, du fait de l'altération des cellules luminales au niveau intestinal. En plus de cette voie endogène d'infection, il a été largement démontré que les entérocoques étaient capables de diffuser par contamination fécale environnementale. En effet, les entérocoques sont doués d'une résistance importante aux conditions environnementales et sont même utilisés comme indicateurs de contamination d'origine fécale dans les eaux de consommation et les échantillons environnementaux (Wheeler *et al.* 2002). Du fait de cette grande résistance aux conditions de stress environnementaux, les entérocoques sont capables de survivre pendant plusieurs mois sur différentes surfaces comme les mains du personnel soignant, le matériel médical souillé (endoscope), ou les différentes surfaces d'une chambre de patient colonisé (poignées de porte, draps etc...), si aucun processus de décontamination n'est mis en place (Figure 5) (Arias et Murray 2012; Kramer *et al.* 2006; Neely et Maley 2000).

La notion d'opportunisme est la résultante de la présence au sein du génome bactérien de gènes codants pour des facteurs de pathogénicité. Ces facteurs d'opportunisme jouent un rôle essentiel dans le processus infectieux puisqu'ils participent à la résistance aux environnements hostiles, ils augmentent l'adhérence bactérienne aux cellules hôtes et aux différentes matrices, ils permettent l'efficacité du processus d'invasion bactérienne en entraînant la lyse des cellules pariétales ou des tissus de l'hôte par l'intermédiaire de protéines sécrétées et ils permettent enfin la régulation de leur propre transcription afin d'affiner au mieux la réponse bactérienne en fonction du stress rencontré (Jett *et al.* 1994). Ils ne sont généralement pas essentiels à la survie de la bactérie mais diminuent de façon importante la pathogénicité du germe en cas d'absence (Van Tyne et Gilmore 2014). Ces facteurs de

virulence sont portés de manière inconstante sur le chromosome bactérien et sont le plus souvent transmis par des éléments génétiques mobiles (plasmides ou transposons par exemple) soit de façon isolée, soit regroupés sous forme d'îlots de pathogénicité (PAI), permettant ainsi une adaptation rapide aux contraintes environnementales (Van Tyne et Gilmore 2014; Lebreton *et al.* 2013; Arias et Murray 2012; Shankar *et al.* 1999). L'acquisition de traits de virulence portés sur des éléments génétiques mobiles entraînant une augmentation de la taille des génomes chez les souches hospitalières comparativement aux génomes de souches dites communautaires (Lebreton *et al.* 2013; K. L. Palmer *et al.* 2012).

Les facteurs de virulence retrouvés jusqu'ici chez les entérocoques sont répartis en 5 grandes fonctions : les facteurs permettant l'adhésion, les facteurs participants à la formation de biofilm, les régulateurs de l'expression de certains gènes, les enzymes lytiques et les facteurs antiphagocytaires (Willems et Bonten 2007).

3. *Enterococcus hirae*, « un modèle d'entérocoque »

E. hirae, tout comme les autres espèces d'entérocoques est généralement retrouvé dans divers environnements comme les sols, les eaux et fait partie intégrante du microbiote intestinal des mammifères dont l'homme (Beukers *et al.* 2017; Solioz et Stoyanov 2003; Klein 2003). *E. hirae* est largement moins retrouvé en pathologie humaine comparativement aux espèces *E. faecium* et *E. faecalis*, toutefois, plusieurs cas d'infections causées par ce germe ont été décrits dans la littérature (Pãosinho *et al.* 2016; Bourafa *et al.* 2015; Dicipinigaitis *et al.* 2015). Cette espèce ne présente pas de phénotype particulier de résistance, cependant des souches résistantes aux antibiotiques utilisés en dernière ligne dans les infections à les bactéries à Gram positif en pathologie humaine, comme la vancomycine ou la daptomycine ont déjà été décrites en médecine vétérinaire et dans l'industrie agro-alimentaire (Peng *et al.* 2016; Iweriebor *et al.* 2016).

3.1. *E. hirae* comme modèle pour l'étude de l'homéostasie du cuivre

Parmi les bactéries à Gram positif, certaines sont dites bactéries lactiques. Les entérocoques font partie de ce groupe. Ce groupe bactérien a fait l'attention de nombreuses études du fait de son importante utilisation dans l'agro-alimentaire et dans la préservation de certains aliments. Le caractère éponyme essentiel de ces bactéries est la production d'acide à partir de la fermentation des hydrates de carbones et par conséquent l'acidification importante de l'environnement direct de la bactérie (Gálvez *et al.* 2007). Ce caractère fermentaire est généralement accompagné de la production par ces bactéries de bactériocines, substances toxiques qui inhibent la croissance des bactéries voisines empêchant ainsi une quelconque compétition concernant l'utilisation des substrats nutritifs environnants. La lyse bactérienne accompagnée de la production d'acide par fermentation des sucres entraîne la formation d'un milieu fortement acide autour de ces bactéries engendrant la solubilisation de complexes

ioniques métalliques. Cette solubilisation d'ions métalliques entraîne généralement une forte augmentation de la concentration en ions métalliques, dont fait partie le cuivre. Le cuivre est un ion métallique bien connu dont l'excès a un effet toxique sur les bactéries mais aussi sur différents organismes dont l'homme, en se fixant fortement sur diverses molécules biologiques tels que les acides nucléiques, les protéines ou les lipides, générant ainsi un stress oxydatif généralement létal pour la cellule (Williams *et al.* 1993). Toutefois, contrairement à d'autres ions métalliques toxiques comme l'argent ou le plomb, le cuivre est un élément essentiel à la physiologie cellulaire puisqu'il est utilisé comme co-facteur par une trentaine de métalloenzymes d'organismes supérieurs comme la superoxyde dismutase chez les entérocoques (Kakinuma 1998; Karlin 1993). *E. hirae* a largement servi de modèle afin de mieux appréhender le contrôle de l'homéostasie du cuivre chez les procaryotes. En effet, *E. hirae* possède un système de régulation dont l'élément principal est un opéron composé de 4 gènes *copY*, *copZ*, *copA* et *copB*. Les gènes *copA* et *copB* codant pour une ATPase permettant le transport du cuivre, *copY* codant pour un répresseur cuivre-dépendant, permettant la dépression de la transcription de l'opéron *cop* en cas d'excès de cuivre dans le milieu. Enfin, le gène *copZ* code pour une protéine chaperone servant dans le transport intracellulaire du cuivre (Figure 8). La présence de l'opéron *cop* permet la croissance de *E. hirae* dans un milieu extrêmement riche (> 8 mM), mais aussi dans un milieu pauvre en cuivre (Solioz *et al.* 2010; Magnani et Solioz 2005).

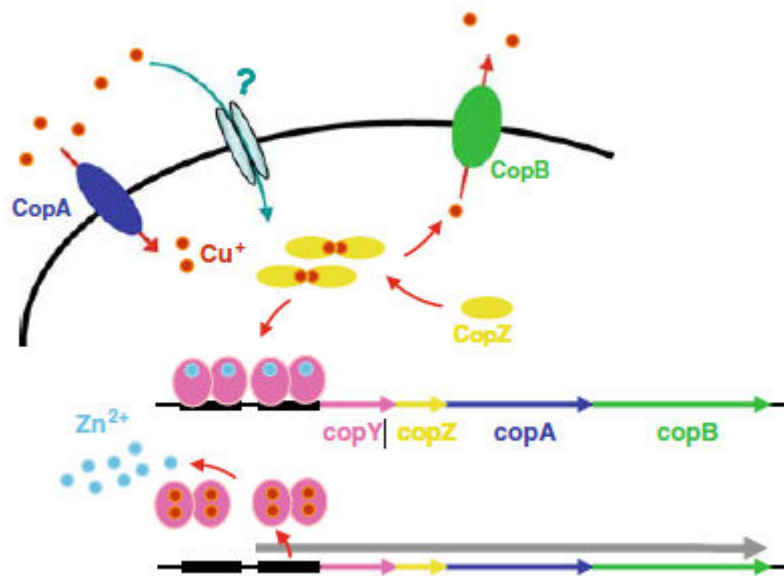


Figure 8. Homéostasie du cuivre chez *E. hirae* (Solioz *et al.*, 2010). Le cuivre pénètre dans la cellule via la protéine CopA ou par une voie non spécifique. Le cuivre en excès au niveau cytoplasmique se lie à CopZ qui transfère alors un ion Cu^+ afin de l'exporter vers le milieu extracellulaire, mais aussi au répresseur CopY afin d'induire la transcription de l'opéron *cop*.

E. hirae, et plus précisément son système d'import/export formé par les ATPases CopA et CopB, a servi de modèle d'étude pour des pathologies humaines et plus précisément les maladies de Menkes et Wilson. La maladie de Menkes est une pathologie héréditaire liée au chromosome X entraînant une perturbation importante du métabolisme du cuivre. Le taux de cuivre est ici normal au niveau des cellules hépatiques mais s'accumule de façon dramatique au niveau des cellules de la muqueuse intestinale, des reins et des tissus conjonctifs du fait d'un défaut dans l'export du cation. La maladie de Wilson est une maladie autosomique où l'excrétion de cuivre dans la bile est réduite, entraînant une accumulation au niveau des cellules hépatiques mais aussi dans d'autres tissus. Dans ces deux pathologies, les gènes candidats supposés responsables codent pour des ATPases proches de la protéine CopA retrouvée chez *E. hirae* (Solioz *et al.* 1994). L'étude de l'opéron *cop* chez *E. hirae* et son rôle

dans le métabolisme du cuivre a ainsi permis de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de ces maladies humaines.

4. Xénobiotiques antimicrobiens et résistance chez les entérocoques

4.1. Généralités

Les xénobiotiques antibactériens ou molécules antibiotiques sont des substances naturelles produites par des organismes vivants, hémisynthétiques ou entièrement synthétisées, qui vont par fixation sur une cible spécifique de la bactérie soit bloquer sa croissance (antibiotiques bactériostatiques), soit avoir une action létale sur cette dernière (antibiotiques bactéricides). Les antibiotiques sont regroupés en différentes classes selon leur mécanisme d'action (Tableau 1).

Tableau 1. Tableau récapitulatif des différentes familles d'antibiotiques utilisés en médecine humaine classées selon leur mécanisme d'action. Les antibiotiques dont la résistance est étudiée dans ce manuscrit sont en gras.

Mécanismes d'action des molécules antibiotiques

<u>Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne</u>	<u>Interférence avec le métabolisme de l'ADN bactérien</u>	<u>Inhibition de la synthèse protéique</u>	<u>Déstabilisation de la membrane</u>
β-lactamines	Quinolones	Aminoglycosides	Daptomycine
Glycopeptides	Rifampicine	Macrolides et apparentés	Polymyxines
Fosfomycine	Sulfamides	Tétracyclines (dont glycyliclines)	
		Acide fusidique	
		Oxazolidinones	
		Phénicolés	

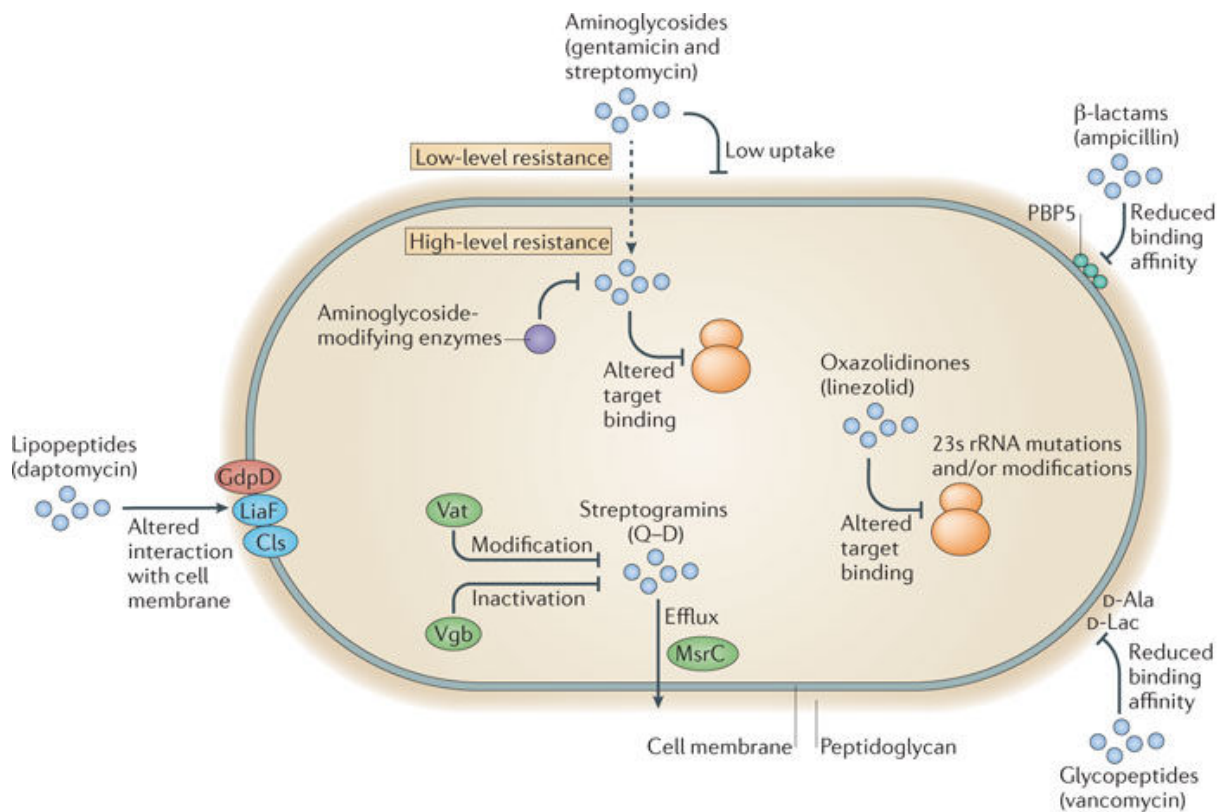
La notion d'antibiotiques a été mise en lumière par Sir Alexander Flemming en 1929 lorsque ce dernier démontra l'inhibition de la croissance d'une souche de *Staphylococcus aureus* en présence d'une colonie de *Penicillium* dans le milieu de culture. A partir de cette découverte, la forme chimique, utilisable *in vivo* et produite industriellement de la pénicilline verra le jour en 1942 afin d'être utilisée sur le front de la seconde guerre mondiale (Skvara 2004). Très rapidement après l'introduction de la pénicilline en médecine humaine et son utilisation massive, des souches de *S. aureus* résistantes à cette molécule font leur apparition (Demerec 1945, 1949). Il est à noter que des souches résistantes sont aussi rapidement décrites en médecine vétérinaire (McCulloch 1947). Les antibiotiques sont également utilisés de façon intensive en agriculture, dans l'élevage animal mais aussi dans l'aquaculture afin de réduire le développement de pathologies infectieuses et également favoriser la croissance animale (Economou et Gousia 2015). L'utilisation des antibiotiques a augmenté de près de 40% entre 2000 et 2010 à l'échelle mondiale, d'où l'émergence de souches toto-résistantes et donc une problématique d'impasse thérapeutique importante. En France, actuellement, environ 160 000 personnes contractent une infection à germe multi-résistant et environ 12 500 en meurent.

4.2. Résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance bactérienne est médiée par trois mécanismes principaux : i) la diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique par imperméabilité membranaire et/ou efflux actif, ii) la diminution d'affinité de l'antibiotique pour sa cible due à une modification ou une protection de celle-ci et enfin iii) la modification ou l'inactivation de l'antibiotique lui-même par un processus enzymatique. On distingue deux types de résistance aux antibiotiques : la résistance dite « naturelle » et la résistance dite « acquise ». La résistance « naturelle » est retrouvée chez la totalité des souches d'une espèce bactérienne et dépend des capacités intrinsèques de la cellule bactérienne (ex. colistine et bactéries à Gram positif). La

résistance « acquise » ne concerne qu'une partie des souches d'une même espèce naturellement sensible. Cette résistance est généralement due soit à l'apparition d'une mutation génétique ponctuelle se transmettant seulement aux cellules filles soit par l'acquisition horizontale d'un gène de résistance par l'intermédiaire d'un élément génétique mobile (ex. transposons, plasmides).

Les entérocoques possèdent de nombreuses résistances naturelles aux antibiotiques comme les aminosides (à bas niveau), les fluoroquinolones, les céphalosporines ou encore la clindamycine chez toutes les espèces sauf *E. faecium*, *E. hirae* et *E. durans*. Ces nombreuses résistances naturelles expliquent en partie l'émergence de certaines espèces comme germes opportunistes nosocomiaux. En plus de ces résistances dites naturelles, de nombreuses résistances acquises aux principales classes d'antibiotiques utilisées dans le traitement des infections à entérocoques que sont les pénicillines, les glycopeptides et les aminosides lorsque ces derniers sont utilisés en association (haut niveau de résistance) ont été rapportées (Cattoir et Leclercq 2013; Leclercq 1997) (Figures 9 et 10) (Tableau 2).



Nature Reviews | Microbiology

Figure 9. Les différents mécanismes de résistance chez les bactéries du genre *Enterococcus* (Arias et Murray, 2012).

On observe en effet au sein du génome de certaines espèces d'entérocoques, la présence de plasmides sur lesquels sont retrouvés des gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques mais aussi dans la virulence (ex. gènes codants pour des protéines permettant la colonisation de l'hôte infecté) (Jolivet *et al.* 2016; Sharifi-Rad *et al.* 2016). Cependant, il est intéressant de noter que cette acquisition de gènes de résistance et/ou virulence a un impact non négligeable sur la bactérie. En effet, ce gain génétique permet aux bactéries de s'adapter à leur environnement en présence d'antibiotique et donc de répondre favorablement à la pression de sélection induite par ces derniers. Cependant, lorsque le milieu est exempt de toute trace d'antibiotique ou que les concentrations environnantes sont négligeables, ces modifications du génome bactérien peuvent avoir un effet délétère pour cette dernière en impactant de façon importante son fitness, on parle alors de coût biologique. Encore une fois,

les cellules bactériennes montrent une propension à s'adapter aux contraintes environnementales puisque si l'acquisition de gènes de virulence ralentit leur croissance dans certaines conditions, les cellules bactériennes peuvent alors développer de nouvelles mutations dites compensatoires afin de parvenir à leur maintien dans un milieu en l'absence d'antibiotique, comme par exemple la répression de l'expression de gènes ou encore la présence d'un caractère inductible comme c'est le cas chez les entérocoques avec la résistance de type VanB (Maisnier-Patin et Roth 2015; Cattoir et Leclercq 2013).

Dans ce manuscrit, nous étudierons les mécanismes de résistance généraux aux antibiotiques utilisés en clinique chez *E. faecium*, mais aussi vis-à-vis des lincosamides et streptogramines ainsi qu'à la tigécycline, antibiotiques ayant pour cible la synthèse protéique bactérienne et qui peuvent être utilisés comme alternative thérapeutique en particulier dans un contexte d'infections causées par des souches d'ERV.

Tableau 2. Résistance de l'espèce *E. faecium* aux principales familles d'antibiotiques.

^a MLS : Macrolides, Lincosamides, Streptogramines

Antibiotiques	Mécanisme d'action (par inhibition)	Résistance
β-lactamines	Synthèse de la paroi bactérienne	Naturelle (bas niveau)
		Acquise (haut niveau)
Glycopeptides		Acquise (haut niveau)
Fosfomycine		Naturelle (bas niveau)
Quinolones		Naturelle (bas niveau)
		Acquise (haut niveau)
Aminosides	Synthèse des acides nucléiques	Naturelle (bas niveau)
		Acquise (haut niveau)
Rifampicine		Acquise
Sulfamides		Naturelle
MLS ^a		Acquise
Linézolide		Acquise
Phénicolés		Acquise
Acide fusidique	Synthèse des protéines	Acquise
Tetracyclines		Acquise
Glycylcyclines		Acquise
Oxazolidinones		Acquise

4.3. *E. faecium* et évolution de la résistance aux antibiotiques

E. faecium, comme toutes les espèces appartenant au genre *Enterococcus*, présente naturellement de nombreuses résistances aux antibiotiques. En effet, les entérocoques présentent une résistance intrinsèque de bas niveau aux céphalosporines du fait de la production de protéines liant les pénicillines (PLP) de très faible affinité pour cette classe d'antibiotiques (Cattoir et Giard 2014). Les entérocoques présentent également une résistance naturelle de bas niveau aux molécules de la classe des aminoglycosides ou aminosides. En effet, ces bactéries ne possèdent pas de système énergétique adéquat afin de permettre l'entrée des aminosides au sein de la cellule bactérienne via un système de transport énergie dépendant (Klare *et al.* 2003; Leclercq *et al.* 1988). Cependant, cette problématique peut être contrecarrée en utilisant les aminosides en association avec un antibiotique dont le mécanisme d'action est dirigé sur la paroi bactérienne. Il a été en effet démontré par des expériences de radio-marquage que lorsque les aminosides sont associés aux β -lactamines ou aux glycopeptides, leur concentration intracellulaire augmentait fortement du fait de la dégradation de la paroi bactérienne (Murray 1990). Ce principe permet donc l'utilisation de cette classe d'antibiotiques en association avec les antibiotiques actifs sur la paroi bactérienne lors d'infections graves à entérocoques comme les endocardites. Cependant, il est important de noter que l'espèce *E. faecium* est naturellement résistante à certains aminosides (tobramycine et kanamycine) du fait de la production d'enzymes (l'acétyltransférase AAC(6')-II et la méthyltransférase EfmM) (Arias et Murray 2012; Costa *et al.* 1993), interdisant l'utilisation de ces molécules. Dans les paragraphes suivants, nous aborderons les différentes résistances retrouvées chez les entérocoques en général avec une attention particulière sur les macrolides et apparentés et la tigécycline.

4.4. La résistance aux β -lactamines chez les entérocoques

Les β -lactamines sont des molécules antibiotiques largement utilisées en thérapeutique humaine qui possèdent au sein de leur structure chimique moléculaire un noyau β -lactame. On retrouve dans cette famille différentes classes d'antibiotiques comme les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes, les monobactames et les inhibiteurs de β -lactamases. Cette famille d'antibiotique, et en particulier l'amoxicilline et son dérivé l'ampicilline, demeure le gold standard dans le traitement des infections à entérocoques. Les β -lactamines sont des antibiotiques qui agissent sur la paroi bactérienne en bloquant le processus de transpeptidation. Cette étape, réalisée par des enzymes spécifiques appelées transpeptidases, permet la jonction des précurseurs du peptidoglycane par l'intermédiaire de jonctions interpeptidiques (Mainardi *et al.* 2008; Sauvage *et al.* 2008) (Figure 11). Les transpeptidases sont communément appelées protéines liants la pénicilline (PLP) du fait de la très grande affinité de l'antibiotique pour ces dernières (Mainardi *et al.* 2008). La sensibilité aux pénicillines est donc corrélée à la capacité que possède l'antibiotique à se fixer sur ces PLP. On retrouve chez les entérocoques de manière constante, une PLP de faible affinité pour la pénicilline appelée PLP5. La présence de cette PLP5 induit, une nette augmentation des valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) des pénicillines d'un facteur pouvant aller jusqu'à 100 par rapport aux CMI de la pénicilline retrouvées chez les streptocoques et une résistance de haut niveau aux molécules de la famille des céphalosporines (Miller *et al.* 2014; Patterson *et al.* 1988). Ce manque d'affinité de la PLP5 est encore plus marqué chez *E. faecium* ce qui entraîne une augmentation de CMI aux pénicillines par rapport aux autres espèces d'entérocoques (Rice *et al.* 2009; Arbeloa *et al.* 2004; Bush 1989). Dès le début des années 1980, des souches d'entérocoques résistants aux pénicillines par production d'une β -lactamase ont été rapportées, suivies dès le début des années 1990 par la description de

souches résistantes de haut niveau aux aminopénicillines. Ces souches présentaient des CMI très élevées aux pénicillines ainsi qu'à toutes les β -lactamines (Cattoir et Leclercq 2013).

4.5. Résistance acquise aux aminosides

La résistance aux aminosides a largement émergé au sein des entérocoques au début des années 80 (Figure 10) avec la mise en évidence de déterminants de résistance portés sur des éléments génétiques mobiles. Ces gènes codent pour 3 types d'enzymes: les phosphotransférases (APH), les acétyltransférases (AAC) et les nucléotidyltransférases (ANT) qui vont pouvoir modifier les aminosides en différentes positions de leurs squelettes chimiques. Chez *E. faecium*, on peut retrouver chez de nombreuses souches responsables d'infections hospitalières et donc parfaitement adaptées à ce milieu, une enzyme bifonctionnelle appelée AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia dont les gènes codants sont portés par un transposon de type Tn5281 (Woodford *et al.* 1993). La présence de cette enzyme bifonctionnelle a pour conséquence l'apparition d'une résistance de haut niveau à tous les aminosides utilisables en clinique (exceptée la streptomycine), dont la gentamicine. Cette résistance de haut niveau est également rencontrée chez les souches de *E. faecalis*. Dès lors que ce type de résistance existe, l'utilisation thérapeutique des aminosides, même en association, n'est plus envisageable.

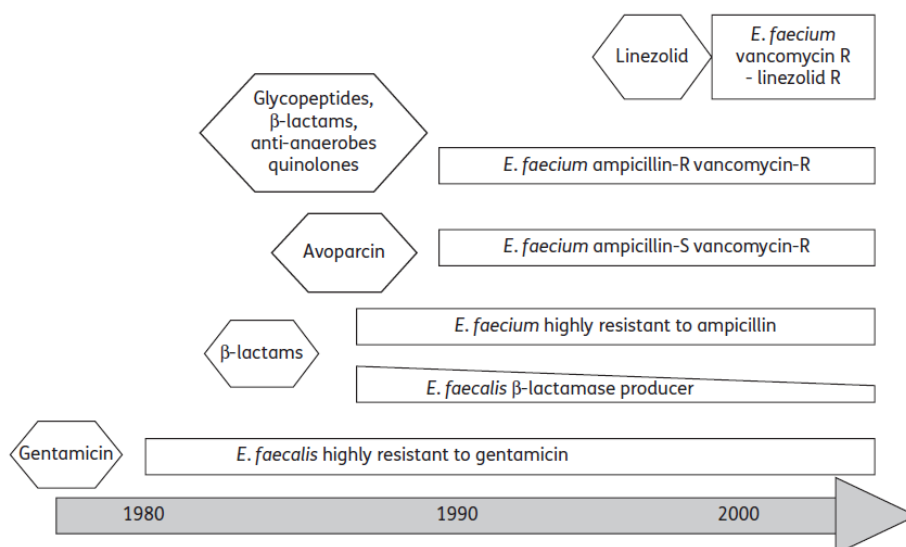


Figure 10. Evolution de l'antibiorésistance chez les entérocoques au cours des 40 dernières années (Cattoir et Leclercq, 2013)

4.6. Résistance aux glycopeptides

Les antibiotiques de la famille des glycopeptides sont des molécules bactéricides majeures dont le spectre d'action est exclusivement dirigé contre les bactéries à Gram positif du fait de leur mécanisme d'action. Les glycopeptides bloquent la synthèse du peptidoglycane (PG), élément essentiel dans la constitution de la paroi bactérienne chez les bactéries à Gram positif. En effet, les glycopeptides, qui sont des molécules de haut poids moléculaire (1448 Da), ne traversent pas la membrane externe des bactéries à Gram négatif et sont donc inactives contre celles-ci. Ces molécules présentent une forte affinité pour l'extrémité terminale des précurseurs du PG constituée d'un motif dipeptidique D-Ala-D-Ala, avec une fixation par l'intermédiaire de 5 liaisons hydrogènes. Cette fixation entraîne un encombrement stérique empêchant l'action des transglycosylases et des transpeptidases inhibant ainsi le branchement du motif néoformé sur le PG existant (Cattoir et Leclercq 2013; Mainardi *et al.* 2008; Reynolds 1989) (Figure 11).

Deux molécules sont utilisées en médecine humaine, la vancomycine et la teicoplanine. La vancomycine, synthétisée à partir d'extrait d'un streptomyces tellurique, *Amycolatopsis orientalis*, dès la fin des années 1950 a largement été utilisée dans le traitement des infections dues aux premières souches de *S. aureus* résistants à la pénicilline, apparues dans les années 1960 en milieu hospitalier (Leclercq 1997). L'émergence de souches à Gram positif comme les entérocoques ou certains streptocoques résistants aux β -lactamines conventionnelles a conduit à une utilisation très importante de ces antibiotiques depuis une trentaine d'année. De plus, des dérivés de ces molécules comme l'avoparcine ont largement été utilisés dans l'agriculture comme facteurs de croissance pour les animaux. Ces deux facteurs couplés, engendrant l'émergence de souches bactériennes résistantes aux glycopeptides (Bates 1997).

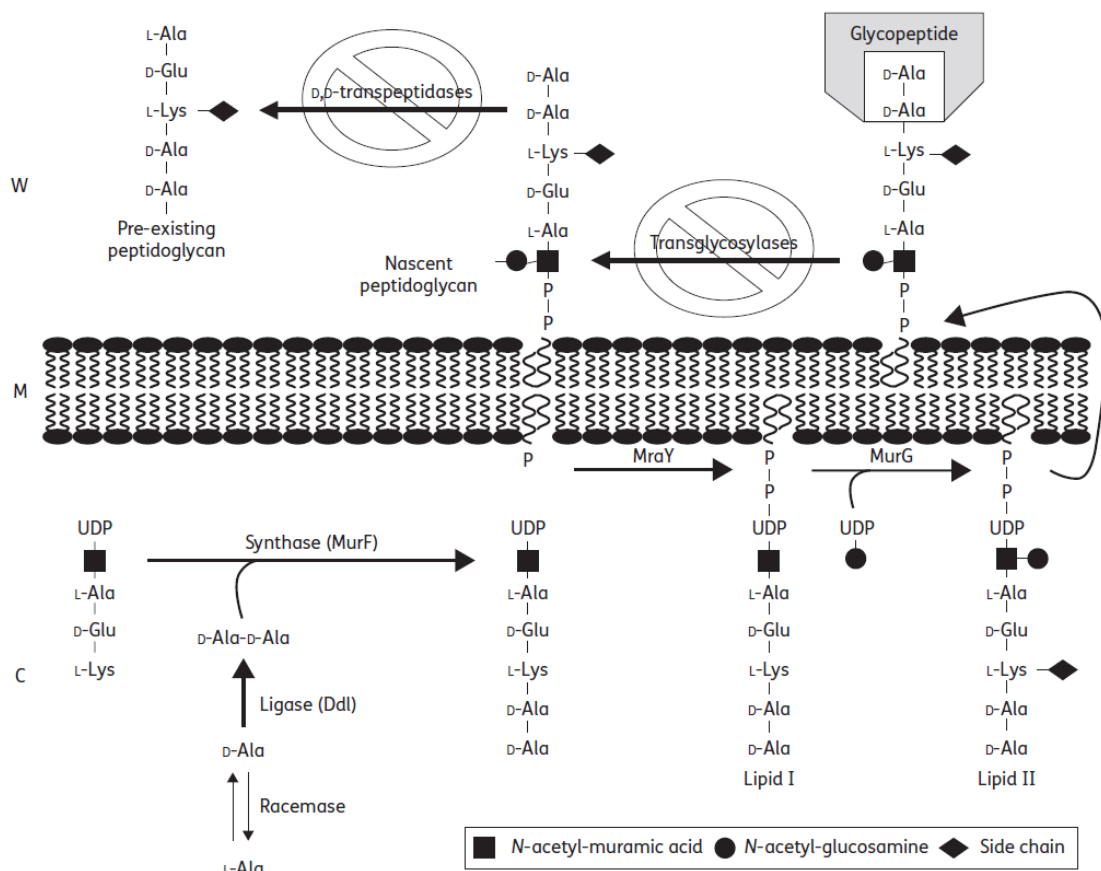


Figure 11. Représentation schématique de la biosynthèse du peptidoglycane (Cattoir et Leclercq, 2013).

La résistance aux glycopeptides chez les entérocoques s'explique par une modification de la cible de ces antibiotiques. En effet, il s'agit de la synthèse de précurseurs du PG dont l'extrémité dipeptidique de la chaîne latérale est substituée, ce qui a pour conséquence une baisse importante de l'affinité de l'antibiotique pour cette dernière. Les précurseurs ainsi formés se terminent soit par un motif dipeptidique D-Ala-D-Lac ou D-Ala-D-Ser (diminution d'affinité de 1000 et 7 fois, respectivement) en lieu et place du motif D-Ala-D-Ala physiologiquement retrouvé (Cattoir et Leclercq 2013; Arthur *et al.* 1996). La modification de la nature des deux peptides composant l'extrémité de la chaîne latérale des précurseurs du PG néoformés est due à l'expression par la bactérie de gènes composant un opéron de résistance (opéron *van*) qui code pour des enzymes impliquées dans la synthèse directe des précurseurs de faible affinité, mais aussi dans la dégradation du précurseur normal, D-Ala-D-Ala. Cette résistance est dite hétérogène d'un point de vue phénotypique mais aussi génotypique et permet une classification basée sur la séquence des gènes *van* (Dutka-Malen *et al.* 1990). Il existe à ce jour neuf opérons de résistance décrits *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* et *vanN* (Lebreton, Depardieu, et al. 2011; Xu et al. 2010; Boyd et al. 2008; Courvalin 2006; Depardieu et al. 2004) dont huit sont des résistances acquises et une naturelle chez les espèces *E. gallinarum* et *E. casseliflavus* (*vanC*). Parmi ces différents opérons décrits, les résistances de type VanA et VanB, portées par les transposons Tn1546 et Tn1547 (situés généralement sur des plasmides conjugatifs), sont les plus souvent décrites comme responsables de la résistance aux glycopeptides dans les souches cliniques d'ERV (Cattoir et Leclercq 2013; Courvalin 2006).

Tableau 3. Récapitulatif des différents types de résistance aux glycopeptides chez les entérocoques (adapté de Cattoir et Leclercq, 2010).

Résistance	Acquise								Naturelle
	Haut		Variable	Modéré		Bas			
Niveau	VanA	VanM	VanB	VanD	VanE	VanG	VanL	VanN	VanC1/C2/C3
Type	VanA	VanM	VanB	VanD	VanE	VanG	VanL	VanN	VanC1/C2/C3
CMI (mg/L)									
Vancomycine	64-1000	>256	4-1000	64-128	8-32	16	8	16	2-32
Teicoplanine	16-512	48	0.5-1	4-64	0.5	0.5	0.5	1	0.5-1
Transfert	+	+	+	-	-	+	-	+	-
Espèces	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. casseliflavus</i> <i>E. gallinarum</i>
	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>					
Expression	Inductible	Inductible	Inductible	Constitutive	Inductible Constitutive	Inductible	Inductible	Constitutive	Constitutive Inductible
Support génétique		Plasmide (Chromosome)		Chromosome (Plasmide)	Chromosome	Chromosome	?	Chromosome	Chromosome
Précurseurs	D-Ala-D-Lac				D-Ala-D-Ser				

Devant l'émergence de souches résistantes aux glycopeptides et en particulier de souches multi-résistantes appartenant au complexe clonal CC17, des impasses thérapeutiques ont rapidement été rapportées dès les années 1990, nécessitant la synthèse de nouvelles molécules, efficaces contre ces souches. Ces molécules comme le linézolide, la daptomycine, la quinupristine-dalfopristine ou encore la tigécycline ont été développées à cet égard. Cependant, de nouveau des cas d'échecs thérapeutiques ou l'apparition de souches résistantes ont été rapidement rapportés dans la littérature (Siné *et al.* 2016; Cattoir *et al.* 2015; Munita *et al.* 2014; Arias *et al.* 2011).

4.7. Résistance au linézolide et à la daptomycine

4.7.1. Linezolide

Le linézolide est un antibiotique de la classe des oxazolidinones, bactériostatique, dont le mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la synthèse protéique en inhibant la fixation de l'aa-ARNt sur le site A du ribosome. Cette inhibition a pour conséquence le blocage de la formation du complexe d'initiation traductionnelle (Shinabarger *et al.* 1997). La résistance au linézolide découle de deux mécanismes, soit l'apparition d'une mutation dans la séquence de l'ARNr 23S (généralement G2505A chez *E. faecium*) (Prystowsky *et al.* 2001), soit l'acquisition d'un gène porté sur un plasmide nommé *cfr*, induisant une méthylation de l'ARNr 23S en position A2053 (Cattoir et Leclercq 2013; Kehrenberg *et al.* 2004). Initialement décrit chez des souches de *Staphylococcus sciuri* (Schwarz *et al.* 2000) et supposé responsable d'une résistance croisée au phénicolés, ce gène a rapidement été décrit comme responsable d'une multirésistance aux phénicolés, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilines et streptogramines A sous l'acronyme phénotype PhLOPS_A. De plus, son transfert horizontal ne fait plus aucun doute puisque de nombreux travaux ont permis de le mettre en évidence dans des souches de *S. aureus*, de *Bacillus* spp. mais aussi chez *E. faecalis* (Diaz *et al.* 2014; Dai *et al.* 2010). Il est à noter que ce gène a été décrit chez une souche clinique de *E. faecium*, porté par un plasmide de résistance, mais sous une forme dite « silencieuse » (Brenciani *et al.* 2016). Une nouvelle molécule appartenant à la famille des oxazolidinone, le tédizolide présenterait l'avantage de voir son activité légèrement modifiée en cas de mutation du 23S (activité toutefois conservée avec des CMI diminuéées de 4 à 8 fois versus linezolide, en cas de mutation du gène codant pour l'ARN 23S) ou lors de la présence d'une méthylase codée par le gène *cfr*. Il est à noter qu'un nouveau variant du gène *cfr*, dénommé *cfr(B)* a récemment été décrit chez *E. faecium* et un autre variant dénommé *cfr(C)* chez *Campylobacter* spp. et *Clostridium difficile* (Tang *et al.* 2017 ; Bender *et al.* 2016).

Un autre gène de résistance aux oxazolidinones a récemment été décrit chez des souches cliniques et animales de *E. faecium*. Il s'agit du gène *optrA* codant pour une protéine ABC proche des protéines ABC de type II appartenant à la famille des *Antimicrobial Resistance Elements* (ARE) déjà connues chez les entérocoques comme Lsa(A), Vga(A) et développées plus tard dans ce manuscrit (Wang *et al.* 2015). Il est à noter que ce gène a également été décrit dans des souches animales de *S. sciuri* (Fan *et al.* 2016).

4.7.2. Daptomycine

La daptomycine est le seul représentant de la famille des lipopeptides cycliques. Cet antibiotique dérive d'une molécule issue de la fermentation de *Streptomyces roseosporus* et présente une forte activité bactéricide sur les bactéries à Gram positif (Jung *et al.* 2008, 2004). L'activité antibactérienne de cette molécule est dépendante de la présence d'ions Ca^{2+} dans le milieu et repose sur sa structure chimique particulière puisqu'elle est formée d'un noyau cyclique hydrophile et d'une queue lipophile. Cette conformation chimique lui permet de former, en association avec les ions Ca^{2+} , un complexe micellaire permettant l'ancrage irréversible de l'antibiotique dans la membrane cellulaire et la formation de canaux responsables d'une rupture de l'intégrité membranaire ayant pour conséquence une fuite d'ions intracellulaires et la mort cellulaire (Humphries *et al.* 2013; Palmer *et al.* 2011; Muraih *et al.* 2011).

La résistance à la daptomycine chez les entérocoques, et plus particulièrement chez *E. faecium*, reste modérée puisque sa fréquence d'apparition spontanée est marginale (Silverman *et al.* 2001). Cependant, de nombreux cas d'échecs thérapeutiques ont été rapportés (Munita *et al.* 2014) dans le traitement de souches avec des CMI < 4 mg/L (catégorisation sensible selon l'EUCAST). L'analyse génomique de ces souches a permis de mettre en évidence le rôle essentiel de mutations au sein d'un opéron (*liaFSR*) dans l'apparition de la résistance.

L'opéron *liaFSR* code pour un système à 3 composants, protéines jouant un rôle clé dans la modification de l'enveloppe cellulaire en conditions de stress (Siné *et al.* 2016; Reyes *et al.* 2015; Munita *et al.* 2014).

D'autres gènes sont également impliqués dans la résistance à la daptomycine comme le gène *cls* codant pour une protéine transmembranaire impliquée dans le métabolisme phosphatidylglycérol/cardioline de la membrane cellulaire (Mishra *et al.* 2012). Enfin, le système YycFGHIJ ou encore les gènes *gdpD*, *mprF* ou *cfa* pourraient être impliqués dans l'apparition d'une résistance à la daptomycine mais leur rôle reste encore à définir.

4.8. Résistance aux antibiotiques de la classe des quinolones

Les antibiotiques de la classe des quinolones et leurs dérivés fluorés en C6, les fluoroquinolones, sont des antibiotiques bactéricides apparus au début des années 1960. Au fur et à mesure des années, différentes générations de quinolones ont fait leur apparition afin d'élargir le spectre d'activité antibactérien et limiter les phénomènes de résistance (Appelbaum et Hunter 2000). Les premières générations de fluoroquinolones présentent un spectre d'activité intéressant contre les bactéries à Gram négatif (d'où leur utilisation massive dans le traitement des infections urinaires) mais plus limité sur les Gram positif, à l'exception du *S. aureus*. Les fluoroquinolones de troisième génération comme la lévofloxacine et surtout de quatrième génération comme la moxifloxacine ont été développées afin de pallier à cette problématique et ainsi élargir le spectre d'activité de cette famille de molécules. Cependant, l'intérêt de leur utilisation reste très limité dans le traitement des infections à entérocoques (Arsène et Leclercq 2007). Il est à noter que ces molécules sont très largement utilisées en agro-alimentaire et dans l'élevage animal. Enfin, ces molécules présentent une faible dégradation et sont donc retrouvées à de fortes concentrations dans l'environnement et en

particulier dans les sédiments de rivières naturelles ou de fleuves (Leclercq *et al.* 2013; Cattoir *et al.* 2008).

Les quinolones présentent une activité bactéricide de par leur activité inhibitrice sur l'ADN gyrase (topoisomérase II) préférentiellement chez les bactéries à Gram négatif et sur la topoisomérase IV préférentiellement chez les bactéries à Gram positif (Ferrero *et al.* 1994; Gellert *et al.* 1976). Ces enzymes jouent donc un rôle essentiel dans la réplication et la transcription bactérienne et permettent de contrôler l'intégrité de l'ADN double brin bactérien. Chacune de ces enzymes est constituée de 4 sous-unités organisées en 2 paires identiques responsables respectivement de la liaison de l'ADN (GyrB/ParE) et de l'action catalytique (GyrA/ParC).

La résistance aux quinolones est médiée par divers mécanismes. En effet, cette résistance a été décrite chez des souches présentant une ou plusieurs mutations dans les gènes codant pour la gyrase et la topoisomérase IV. Ces mutations se situent dans des régions nucléotidiques conservées appelées QRDR (« *Quinolone Resistance-Determining Region* »). Ces résistances se situent surtout au niveau du gène *gyrA* chez les bactéries à Gram négatif et du gène *parC* chez les bactéries à Gram positif (Ferrero *et al.* 1994; Gellert *et al.* 1976). Il a également été rapporté que l'efflux actif était responsable de l'apparition d'une résistance aux quinolones. Chez *S. aureus*, cette résistance est liée à la surexpression du gène *norA* qui code pour une protéine d'efflux de la famille des MFS mais d'autres systèmes de pompes d'efflux peuvent également être impliqués (Costa *et al.* 1993). Chez les entérobactéries, la résistance par efflux est médiée par une surexpression du système AcrAB-TolC du fait de l'apparition de mutations dans le gène répresseur de ce système (*acrR*) et du système AcrEF-TolC à moindre échelle (Poole 2004).

Des déterminants de résistance d'origine plasmidique ont également été rapportés dans la littérature. Parmi ceux-ci on retrouve, le gène *qnr* mis en évidence pour la première fois chez une souche de *Klebsiella pneumoniae* à la fin des années 1990 (Martínez-Martínez *et al.* 1998). Ce gène code pour une protéine QnrA qui va protéger la gyrase et la topoisomérase II de l'action des quinolones (Tran et Jacoby 2002). De nombreux autres déterminants génétiques de la famille des protéines Qnr ont été mis en évidence depuis chez des bactéries à Gram négatif (Cattoir et Nordmann 2009; Cattoir *et al.* 2008) mais aussi chez les bactéries à Gram positif et en particulier *E. faecalis* avec la protéine EfsQnr (Arsène et Leclercq 2007) et *E. faecium* (Rodríguez-Martínez *et al.* 2008). Ces protéines Qnr-like chez les bactéries du genre *Enterococcus* sont toutes d'origine chromosomique, phénomène qui pourrait expliquer en partie la relative résistance de ces bactéries aux quinolones. Le gène *aac(6')Ib-cr* est également un déterminant génétique responsable de l'apparition d'une résistance aux quinolones porté par une super cassette de résistance au sein d'un intégron lui-même porté par un plasmide de résistance. Ce gène code pour une protéine bi-fonctionnelle jouant le rôle d'acétyl-transférase impliquée dans la résistance aux aminosides, mais aussi capable d'acétyler les fluoroquinolones au niveau de leur groupe amino-nitrogène du substituant piperazinyle (Robicsek *et al.* 2006).

4.9. Les macrolides-lincosamides-streptogramines et pleuromutilines (MLSP)

Les premiers macrolides ont été extraits en 1950 à partir d'espèces de *Streptomyces*, ce qui a donné naissance à l'érythromycine, toujours utilisée aujourd'hui. Depuis, de nombreux macrolides et apparentés ont été mis sur le marché. De nos jours, les MLSP constituent une des classes d'antibiotiques les plus utilisés dans le monde. Les pleuromutilines, antibiotiques à visée vétérinaire commencent à être utilisés chez l'homme du

fait de leur activité intéressante sur les SARM, les ERV et le pneumocoque. Ces molécules dérivent d'un extrait de champignon et possèdent un mécanisme d'action proche des MLS. Les MLSP sont des antibiotiques distincts chimiquement mais rassemblés dans un même groupe. Ceci est en partie justifié d'une part, par le fait que ces inhibiteurs de la synthèse protéique ont un mode d'action proche, et d'autre part par la résistance croisée due à la modification de la cible qui a longtemps été la seule connue (Leclercq 2002).

Les macrolides sont des antibiotiques composés d'au moins deux sucres aminés ou neutres attachés à un grand noyau lactonique de taille différente selon le produit. En effet, il existe à l'heure actuelle plusieurs classes de macrolides en fonction du nombre d'atomes qui composent ce noyau lactonique (Bryskier *et al.* 1993) (Figure 12). On distingue donc, les macrolides à 14 atomes (ex. érythromycine, clarithromycine), les macrolides à 15 atomes (ex. azithromycine) et ceux à 16 atomes (ex. josamycine, spiramycine). Enfin, un sous-groupe a fait son apparition à la fin du siècle dernier, il s'agit des kétolides, molécules dérivées de la clarithromycine (ex. télithromycine).

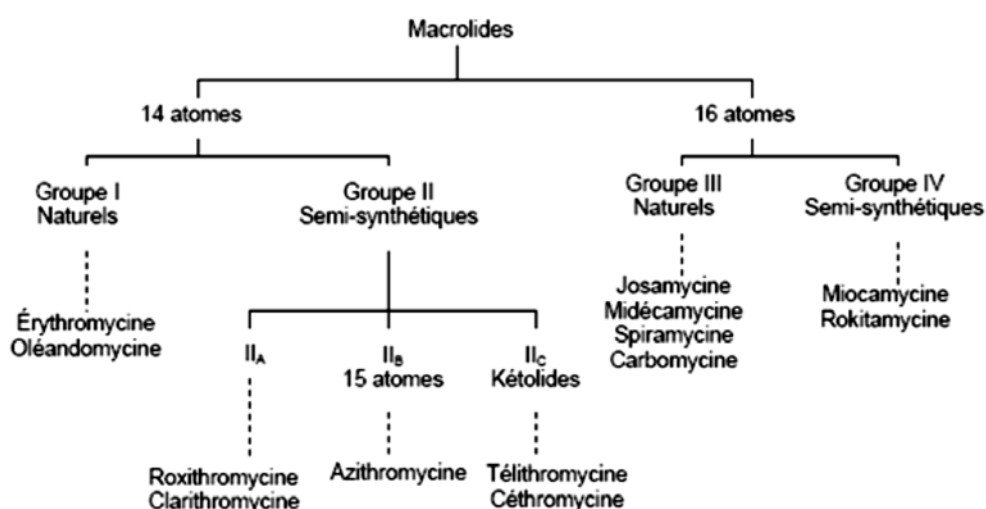


Figure 12. Classification des molécules appartenant à la classe des macrolides (Bryskier *et al.* 1993)

Les lincosamides sont constitués de 3 parties : un acide aminé, la L-proline, et un sucre, dérivé de l'octose, reliés entre eux par une liaison amide (Bryskier *et al.* 1993). Deux molécules sont utilisées en thérapie humaine actuellement : la lincomycine, isolée de *Streptomyces lincolnensis*, et surtout son dérivé hémisynthétique 7-chloro-7déoxy, la clindamycine (Figure 13).

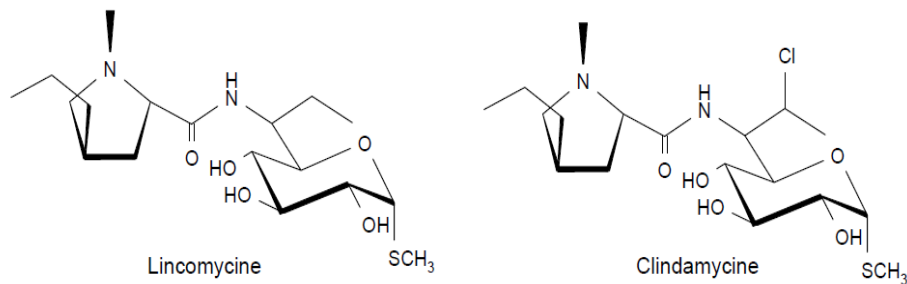


Figure 13. Structure chimique de la lincomycine et de son dérivé hémisynthétique, la clindamycine (Bryskier *et al.* 1993)

Les streptogramines (aussi appelées synergistines) forment un groupe complexe d'agents antibactériens uniques. Ils sont composés d'un mélange de deux types de molécules : les streptogramines A (SgA) (ex. pristinamycine IIA, dalfopriline), peptolides macrocycliques insaturés, et les streptogramines B (SgB) (ex. pristinamycine IA, quinupristine), hexadepsipeptides cycliques (Bryskier et Bergogne-Berezin 1999) (Figure 14). Ces deux types de composés agissent synergiquement sur le plan microbiologique comme dans l'association quinupristine-dalfopriline (Q-D) (Synercid[®]) dont l'utilisation est approuvée par la FDA comme alternative de traitement dans les infections à ERV. A noter que la spécialité Synercid[®] ne possède plus d'autorisation de mise sur le marché (AMM) en France.

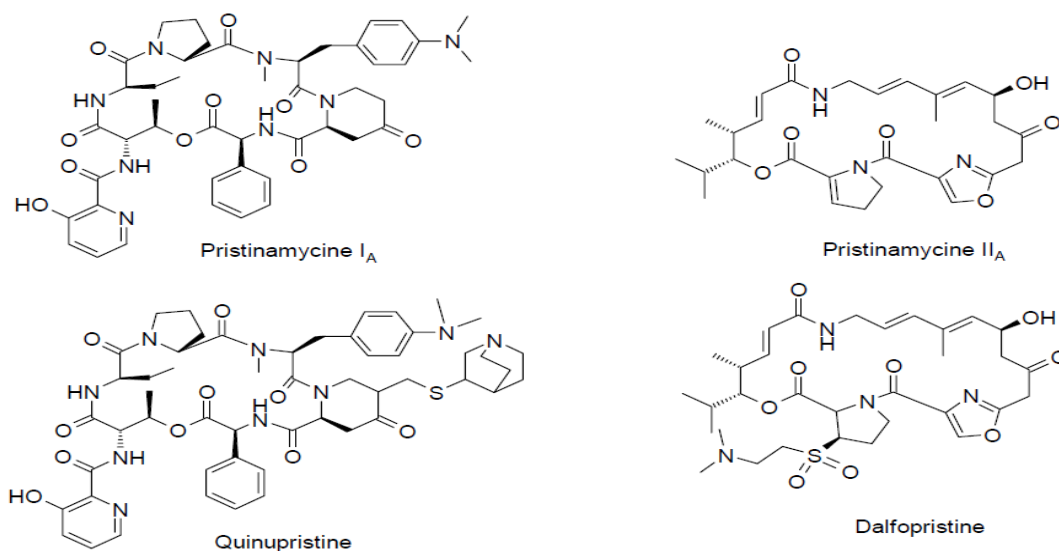


Figure 14. Structure chimique des streptogramines (Bryskier et Bergogne-Berezin, 1999). Deux streptogramines A (pristinamycine IIA et dalfopristine) et deux streptogramines B (pristinamycine IA et quinupristine) sont représentées.

Enfin, les pleuromutilines, molécules extraites du champignon *Pleurotus mutilus* en 1951, sont aussi des inhibiteurs de la synthèse protéique. La tiamuline est un dérivé semi-synthétique de la pleuromutiline composé d'un noyau tricyclique et d'une chaîne carbonnée à partir du C14 du cycle octane utilisé des les années 1970 en médecine vétérinaire. La valnémuline sera elle utilisée dès 1999 (Long *et al.* 2006) (Figure 15). Ce n'est seulement qu'à la fin des années 2000 que les pleuromutilines feront leur apparition en médecine humaine avec la mise sur le marché de la retapamuline sous la forme d'un topique utilisé dans le traitement des impétigos et autres affections de la peau et des tissus mous non compliquées (Novak *et Shlaes*, 2010). Plus récemment, une nouvelle molécule hémisynthétique dérivée de cette famille, la léfamuline, a vu le jour (Paukner *et al.* 2013). Cette dernière fait l'objet de divers essais cliniques de non infériorité dans le traitement de pneumopathies communautaires (phase III, LEAP1 et LEAP 2 ; NCT02559310 et NCT02813694, respectivement), mais aussi

de phase II dans les infections de la peau et des tissus mous (NCT01119105) (Abbas *et al.* 2017; Rubino *et al.* 2015).

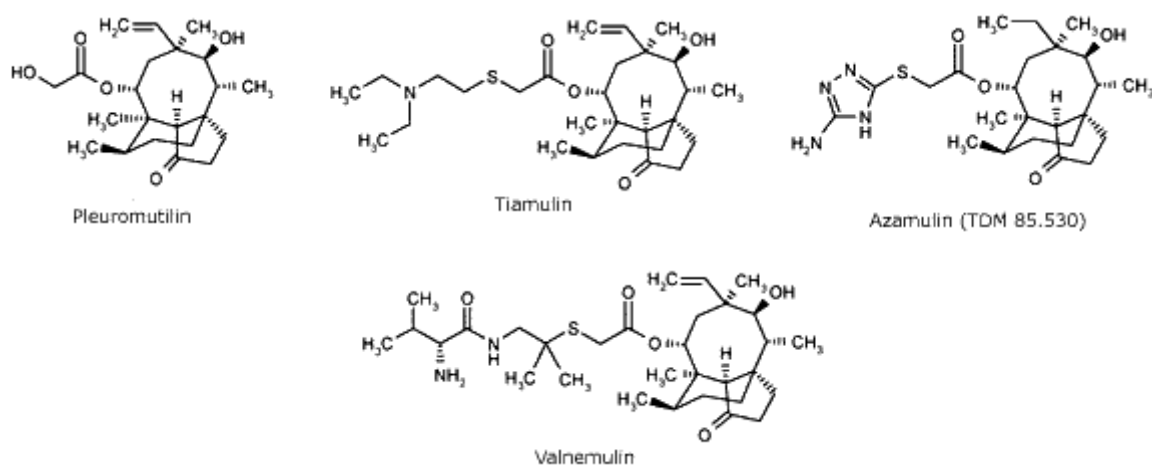


Figure 15. Structure chimique des pleuromutilines (Paukner et Riedl 2017). La pleuromutiline et ses dérivés hémisynthétiques, la tiamuline, la valnémuline et l'azamuline.

Les MLSP ont un spectre d'activité qui inclut essentiellement les bactéries à Gram positif et quelques bactéries à Gram négatif. Les antibiotiques de la classe des macrolides, quel que soit leur groupe, présentent un spectre d'activité assez similaire, principalement orienté contre les microorganismes suivants : i) Cocci à Gram positif : *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., ii) Cocci à Gram négatif : *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis*, iii) Bacilles à Gram positif : *Corynebacterium diphtheriae*, *Listeria monocytogenes*, iv) Bacilles à Gram négatif : *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Campylobacter* spp., *Helicobacter pylori*, *Vibrio* spp., *Haemophilus influenzae*, v) Bactéries anaérobies strictes : *Peptostreptococcus* spp., *Propionibacterium* spp., *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., vi) Bactéries intracellulaires: *Chlamydiae*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia* spp. Les macrolides sont inactifs vis-à-vis de certaines bactéries comme les entérobactéries, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp,

Nocardia spp. et *Bacteroides fragilis*. La télithromycine, seule molécule de la famille des kétolides utilisée en clinique, présente une activité souvent supérieure à celle de l'érythromycine sur les coques à Gram positif sensibles aux macrolides et sur des souches de *S. pneumoniae* résistantes aux macrolides. Les lincosamides présentent un spectre d'activité proche de celui des macrolides. Ils ont une meilleure activité vis-à-vis des mycoplasmes et des bactéries anaérobies mais sont inactifs sur *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *L. pneumophila* et *L. monocytogenes*. La clindamycine a une activité particulière sur les anaérobies, en particulier *Clostridium* spp., *Peptostreptococcus* spp., et possède une activité antitoxinique reconnue dans certaines infections à *S. aureus* toxigènes. Les streptogramines ont un spectre d'action élargi. La pristinamycine est souvent active sur les souches de *S. aureus* résistantes à l'érythromycine tandis que la quinupristine-dalfopristine est approuvée, par la FDA et par les agences du médicament de certains pays européens, dans le traitement des infections sévères à SARM en cas d'échec ou de résistance aux glycopeptides (Batard *et al.* 2002; Pavie *et al.* 2002). Alors que la structure chimique des lincosamides, streptogramines et pleuromutilines est très différente de celle des macrolides, leurs mécanismes d'action sont très proches. Les MLSP inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien et plus précisément au niveau du domaine V de l'ARNr 23S (Long *et al.* 2006; Leclercq 2002).

Le ribosome bactérien est le siège de la traduction de la séquence nucléotidique portée par un ARN messager (ARNm) en une séquence d'acides aminés au sein d'une protéine. C'est une structure cellulaire complexe formée par les différents types d'ARNs bactériens (ARNm, ARN de transfert et ARN ribosomal) et une cinquantaine de protéines dites ribosomales. C'est également une structure essentielle à la cellule qui utilise une grande partie de ses capacités physiologiques pour entretenir leur activité. Chaque cellule procaryote possède environ une centaine de ribosomes, ce nombre variant fortement en fonction des

conditions de croissance de la bactérie (Snyder et Champness 2003). Enfin, il est important de noter que cette structure ribosomale est très largement conservée au décours des différentes espèces ce qui permet d'utiliser certaines séquences nucléotidiques comme outil de classification phylogénique et en particulier le gène codant pour l'ARNr 16S (Lane *et al.* 1985).

Le ribosome complet est dénommé ribosome 70S. Il est composé de 2 sous-unités, i) la sous-unité 30S contenant l'ARNr 16S et ii) la sous-unité 50S formée par l'ARNr 23S et l'ARNr 5S. La petite sous-unité 30S contient un nombre de protéines différent selon l'espèce, en général 21 (S1 à S21), et une molécule d'ARNr 16S codée par le gène *rrs* d'environ 1500 nucléotides. La grande sous-unité 50S contient généralement 36 protéines (L1 à L36), une molécule d'ARNr 23S codée par le gène *rpl* d'environ 2900 nucléotides et une molécule d'ARNr 5S codée par le gène *rfs* d'environ 120 nucléotides (Figure 16). Les gènes codant les différents ARNr sont regroupés au sein du même opéron *rnn*. Les trois ARNr ont une structure secondaire formée de nombreuses tiges-boucles dues à des appariements de bases complémentaires au sein de la séquence nucléotidique. L'ARNr 23S, cible des MLS, est constitué de 101 hélices regroupées en six domaines (Figure 17) notés de I à V. Les protéines assurent, par leurs nombreuses interactions avec l'ARNr, un rôle important dans le maintien de la structure tridimensionnelle du ribosome (Nissen *et al.* 2000).

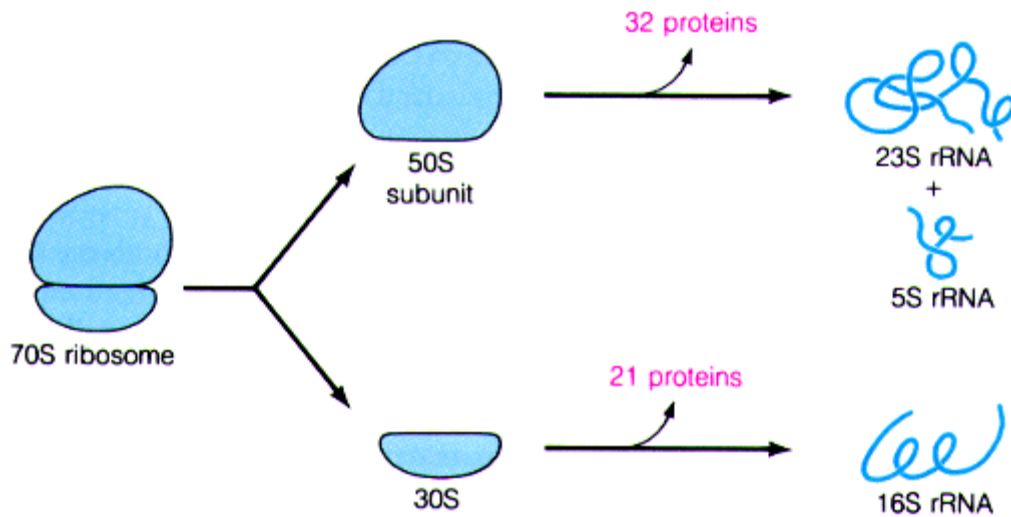


Figure 16. Composition du ribosome bactérien (www.oregonstate.edu). Le ribosome contient une copie de chaque ARNr et différentes protéines ribosomales. Les protéines de la grande sous-unité 50S sont désignées de L1 à L32 et les protéines de la petite sous-unité 30S sont désignées de S1 à S21.

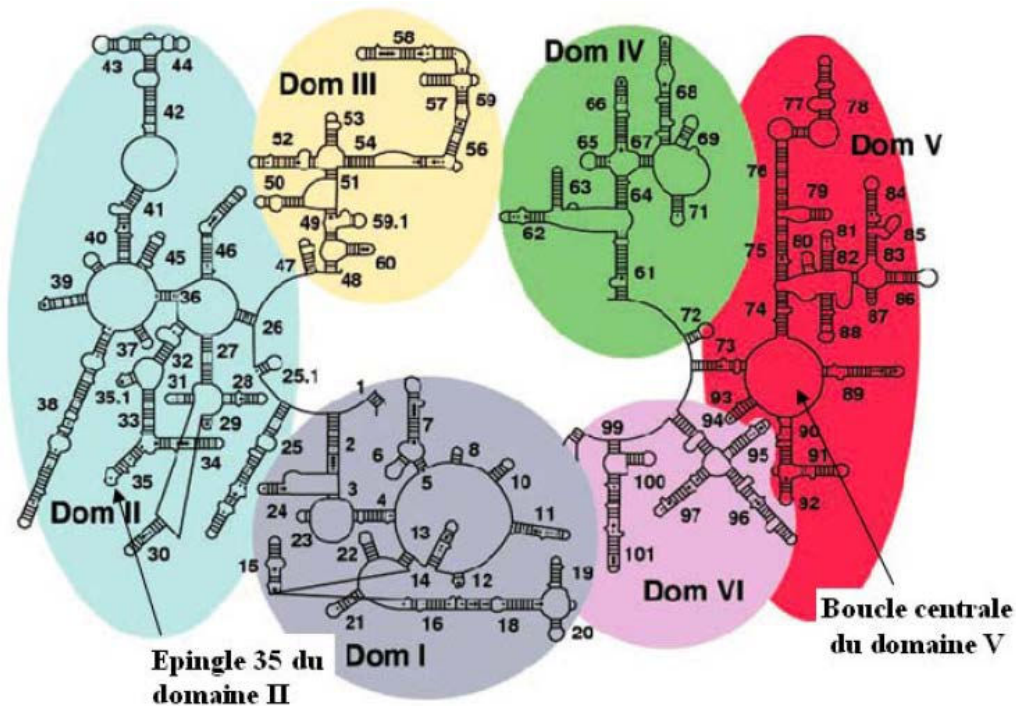


Figure 17. Structure secondaire de l'ARNr 23S (Nissen *et al.* 2000). Les six domaines catalytiques sont numérotés de I à VI. La boucle centrale du domaine V et l'épingle 35 du domaine II, impliqués dans la liaison des macrolides, sont désignés par des flèches.

Les sous-unités 30S et 50S sont libres physiologiquement au sein de la cellule et forment le complexe 70S uniquement lors de la traduction d'un ARNm. Les deux sous-unités jouent des rôles très différents lors de la traduction. Lors de l'initiation de la traduction, la SU 30S va reconnaître une séquence spécifique sur l'ARNm appelé séquence d'initiation. Cette séquence est formée par un codon d'initiation ou codon « start » (AUG ou GUG codant pour une méthionine dans la majorité des cas) précédé d'une séquence de reconnaissance appelée Shine-Dalgarno située à environ 10 nucléotides en amont du codon « start ». La sous-unité 50S vient alors s'assembler sur la sous-unité 30S afin de former le ribosome complet. Dès lors, le rôle de la sous-unité 30S est de sélectionner le bon ARNt pour chaque codon alors que la sous-unité 50S va jouer un rôle dans la formation du peptide néosynthétisé et permettre la translocation des ARNt tout au long du site ribosomale. Durant le phénomène de traduction,

le ribosome va « avancer » tous les 3 nucléotides le long de l'ARNm dans la direction 5'-3' permettant ainsi aux ARNt portants un AA (aminoacyl-ARNt) de rentrer au sein du ribosome au niveau du site A (site accepteur). L'entrée au sein du ribosome est sous la dépendance de l'appariement de l'ARNt avec l'ARNm au niveau de 3 nucléotides complémentaires. On parle alors d'anticodon. Une fois l'aminoacyl-ARNt attaché au ribosome au niveau du site A, une enzyme, la peptidyltransférase (ribozyme 23S) catalyse la réaction d'ancrage entre l'AA présent dans le site A et le peptide néosynthétisé qui se trouve lui au niveau du site P du ribosome. Après cet ancrage, une nouvelle enzyme, la translocase ou « *translation elongation factor G* » (EF-G) va catalyser le transfert du peptide associé à une ARNt situé au niveau du site A vers le site P, libérant ainsi le site A pour l'introduction d'un nouvel aminoacyl-ARNt et entraînant l'ARNt libre vers le site E et donc vers sa sortie du ribosome (Snyder et Champness 2003) (Figure 18). Il faut toutefois noter que le ribosome dans son ensemble n'est pas uniquement formé par les ARNr. De très nombreuses protéines participent à la bonne cohésion de l'ensemble et surtout ont un rôle déterminant dans la traduction en général. Il est bien connu désormais que certaines protéines ribosomales comme les protéines L4 et L22 (responsables d'une résistance aux MLS en cas de mutations) jouent un rôle essentiel dans la formation du tunnel de sortie retrouvé autour du néopeptide synthétisé au sein du ribosome. Il a été aussi démontré que les protéines L19, L22, L24, L29 et L31 participent à l'excrétion du peptide néosynthétisé (Nissen *et al.* 2000).

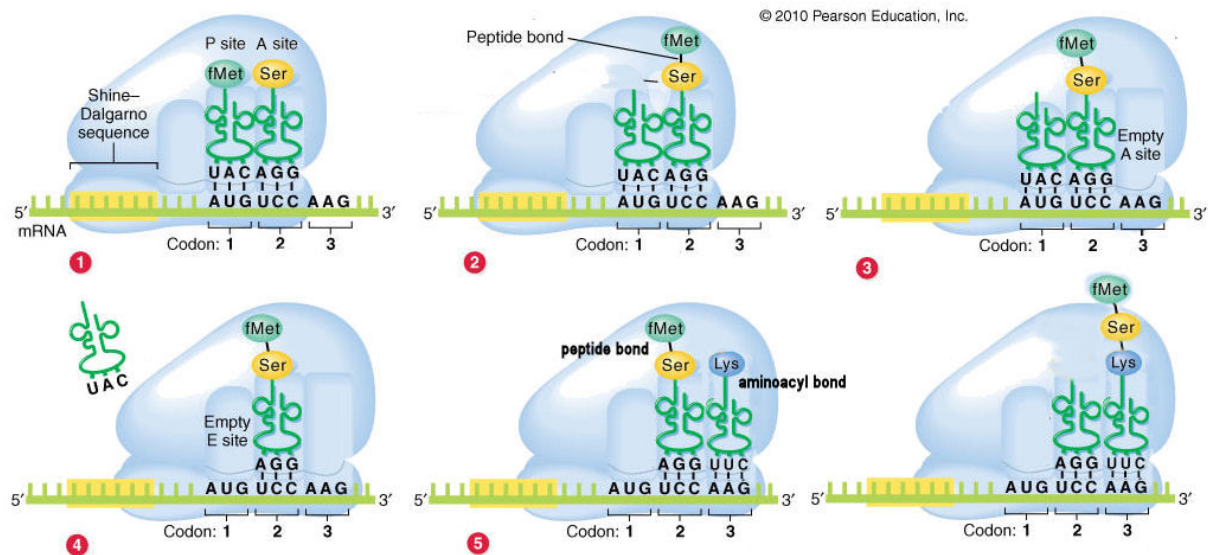


Figure 18. Résumé schématique des différentes étapes de la traduction (Snyder et Champness, 2004). 1. Le complexe fMet-tRNA fait démarrer le processus de traduction et se situe au niveau du site P. L' aminoacyl-ARNt qui suit se situe lui au niveau du site A. 2. Le complexe fMet-tRNA est clivé par la peptidyltransférase et va venir se fixer par une liaison peptidique sur l'acide aminé positionné au niveau du site A. 3. L'ARNt libre au niveau du site P est dirigé vers le site E par la translocase alors que l'ARNt portant le dipeptide se dirige vers le site P laissant le site A libre de recevoir un nouvel aminoacyl-ARNt. 4. L'ARNt libre du site E est éjecté du ribosome. 5. Un nouvel aminoacyl-ARNt vient s'ancrer au niveau du site A. 6. Comme lors de l'étape 2, le dipeptide est clivé et va venir se lier à l' aminoacyl-ARNt situé dans le site A. Le cycle continue ainsi jusqu'à ce qu'un codon STOP soit rencontré.

Il a été largement démontré qu'un bon nombre de ces protéines ribosomales avaient un rôle avéré dans la machinerie traductionnelle, mais aussi un rôle extra-ribosomal. Ce phénomène est plus connu sous le nom de « moonlighting proteins » (Jeffery 2003; Piatigorsky *et al.* 1988). La protéine ribosomale S10 fait partie des protéines les largement étudiées pour son activité « moonlight ». La protéine S10 est un élément essentiel dans l'architecture de la sous-unité 30S du ribosome (Wimberly *et al.* 2000), cible avérée des antibiotiques de la famille des tétracyclines et plus particulièrement de la tigécycline. En plus

de son rôle dans la machinerie ribosomale lors de la traduction, cette protéine peut former un complexe avec la protéine NusB et ce complexe joue alors un rôle de facteur transcriptionnel, essentiel dans le processus d'anti-terminaison de la transcription (Luo *et al.* 2008; Friedman *et al.* 1981). La protéine S10 est codée par le gène *rpsJ*, premier gène d'un grand opéron regroupant 11 gènes codants tous pour des protéines ribosomales.

Nous montrerons dans la partie résultats de ce travail que la mutation du gène *rpsJ* codant pour la protéine S10 pourrait être responsable d'une diminution de la sensibilité à la tigécycline en raison de l'altération de sa cible ribosomale et donc d'une diminution de l'affinité de l'antibiotique pour cette dernière.

La synthèse protéique (ou traduction) correspond à l'expression de la séquence d'un ARNm en chaîne polypeptidique. Outre les deux sous-unités du ribosome, la traduction nécessite la participation de l'ARNm qui porte l'information génétique, des ARNt qui chargent l'acide aminé, et de différents facteurs cytoplasmiques intervenant pendant les différentes étapes d'initiation, d'élongation et de terminaison.

Les MLS inhibent la synthèse protéique en se fixant au ribosome bactérien. L'érythromycine se fixe sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien. Son site de liaison ribosomale est situé à proximité de la base de la cavité qui contient le centre peptidyltransférase, au niveau du domaine V de l'ARNr 23S, où s'effectue la synthèse du peptide et à l'entrée du tunnel qui permet sa libération. La surface de ce tunnel est formée par les domaines I à V de l'ARNr 23S, par les parties globulaires des protéines L22 et L4 et par une chaîne β de L22 (Nissen *et al.* 2000). Les bases cruciales pour la fixation de l'érythromycine sont les adénines en position 2058, 2059 et 2062, la guanine 2505 et l'uridine 2609 (Roberts 2008; Nissen *et al.* 2000) (Figure 17). L'érythromycine bloque par encombrement stérique l'élongation de la chaîne peptidique et provoque ainsi la dissociation

du peptidyl-ARNt dès lors que le peptide a atteint une longueur de 6 à 8 acides aminés. De plus, elle empêche l'assemblage du ribosome au moment de l'initiation de la synthèse protéique. La clindamycine et la lincomycine partagent avec l'érythromycine l'adénine en position 2058 comme site de fixation. Les streptogramines agissent de façon synergique. Ceci a pu être expliqué par une interaction synergique dans la fixation des deux antibiotiques au ribosome. La fixation de la streptogramine A à la paroi du tunnel de sortie des peptides induit un changement de conformation de l'adénine en position 2062. Ce repositionnement permet une fixation de la streptogramine B avec une forte affinité dans un site adjacent à celui de la streptogramine A, occupant ainsi une partie de la lumière du tunnel de sortie (Canu et Leclercq 2001). Enfin, les pleuromutilines présentent un mécanisme d'action comparable à celui des macrolides. Elles inhibent la formation du pont peptidique par fixation dans le centre peptidyltransférase du ribosome (Dreier *et al.* 2012; Lolk *et al.* 2008; Long *et al.* 2006; Leclercq 2002).

Les MLS inhibent donc la synthèse protéique en i) empêchant la formation du pont peptidique, ii) empêchant la progression du peptide naissant dans le tunnel, iii) provoquant la dissociation prématurée du peptidyl-ARNt en cours de synthèse en interférant avec l'assemblage de la sous-unité 50S. Trois mécanismes de résistance aux MLS et pleuromutilines sont principalement retrouvés chez les bactéries à Gram positif : i) une modification de la cible de l'antibiotique, ii) une modification enzymatique de l'antibiotique ou iii) une diminution de la concentration intracellulaire de la molécule (par diminution de la perméabilité et/ou efflux actif). Ces différents mécanismes de résistance, retrouvés chez les bactéries à Gram positif induisent l'apparition de divers phénotypes de résistance aux macrolides et apparentés :

- ❖ Le phénotype MLS_B: il se définit par une résistance croisée aux macrolides, aux lincosamides et aux streptogramines B. Ce phénotype peut être inductible ou constitutif.
- ❖ Le phénotype MS_B (macrolides et streptogramines B): il est inductible par l'érythromycine et touche les macrolides à 14 ou 15 atomes et les streptogramines B.
- ❖ Le phénotype S_A: toutes les souches résistantes aux associations le sont au composé S_A (avec des CMI streptogramines A ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$) et à ses dérivés (pristinamycine IIA, virginiamycine M ou dalfopriline), sans l'être obligatoirement au composé S_B.
- ❖ Le phénotype L: la résistance aux lincosamides est isolée.
- ❖ Le phénotype LS_A(P): caractérisé par une résistance aux lincosamides, aux streptogramines A et le plus souvent aux pleuromutilines. Il est naturellement retrouvé chez *E. faecalis* contrairement à *E. faecium*, *E. hirae* et *E. durans*.

4.9.1. Résistance aux MLS par modification de la cible

Les modifications ribosomales entraînent une résistance consécutive à la diminution d'affinité des MLS pour leur cible. La cible ribosomale peut être modifiée soit par production de méthylases codées par des gènes plasmidiques ou transposables, soit par modification(s) de l'ARNr 23S ou de protéines ribosomales. C'est peu après l'introduction de l'érythromycine en thérapeutique qu'apparaissent les premières souches résistantes de staphylocoques (1956). L'étude de ces souches avait rapidement montré que la résistance était liée à un phénomène de méthylation de la cible ribosomale (Roberts *et al.* 1999). Le phénomène de résistance par méthylation ribosomale est dû à la méthylation d'une seule adénine en position 2058 de l'ARNr 23S. La méthylation de cette adénine empêche la fixation des macrolides à leur cible. L'adénine 2058 étant un point de fixation commun aux macrolides, lincosamides et

streptogramines B, la résistance est croisée entre ces trois groupes d'antibiotiques d'où le nom de MLS_B donné au phénotype de résistance (Leclercq 2002). Cette résistance est due aux gènes *erm* (*erythromycin ribosome methylase*), dont 41 classes sont actuellement décrites et classées selon leur similitude de séquences peptidiques (Roberts *et al.* 1999; Weisblum 1995). Ces gènes sont retrouvés très largement chez les streptocoques mais aussi chez les entérocoques ou encore les staphylocoques. Les gènes *erm* confèrent une résistance croisée de type MLS_B avec différents niveaux d'expression en fonction du type de méthylation qui est engendré (monométhylation ou diméthylation). De plus, cette résistance de type MLS_B peut s'exprimer de différentes manières puisqu'elle peut être constitutive ou inductible. La résistance inductible s'explique par le fait que la bactérie possède bien un gène de type *erm* mais produit un ARNm inactif qui n'est pas en capacité de coder pour une méthylase. Cet ARNm peut s'activer seulement en présence d'une induction produite par la présence d'un macrolide. Ce phénomène n'est pas retrouvé en cas d'expression constitutive où l'ARNm produit par le gène *erm* est activé et peut traduire la méthylase. Le phénomène d'induction est lié à la présence en amont du gène *erm* d'un gène dit atténuateur qui va induire en présence de la molécule inductrice des réarrangements des ARNm permettant alors au ribosome de traduire la séquence codante de la méthylase. L'induction est un phénomène dit post-transcriptionnel très souvent retrouvé dans le cas des méthylases codées par un gène de type *erm*(C) chez *Staphylococcus spp.*, mais a déjà été observé pour les gènes *erm*(A) et *erm*(B) (Lina *et al.* 1999; Weisblum 1995). La présence de ce phénomène d'induction couplée à la grande diversité des méthylases codées par les gènes *erm* peut entraîner l'apparition de nombreux phénotypes MLS_B complexes. Chez *E. faecium*, le phénotype de résistance MLS_B est le plus prévalent. Il est médié par différents types de méthylases mais préférentiellement par la méthylase codée par le gène *erm*(B) (Hershberger *et al.* 2004; Portillo *et al.* 2000).

La résistance aux MLS par modification de la cible peut aussi être liée à l'apparition de mutations dans deux sites distincts. Tout d'abord, dans l'opéron *rrn* codant pour l'ARNr 23S en position 2058 ou 2059 du domaine V. Les bactéries possèdent plusieurs copies de cet opéron au sein de leur chromosome (de 1 à 6 copies en général) et ces mutations sont retrouvées de façon identique sur chacune d'entre elles, rendant ce mécanisme de résistance relativement rare chez les bactéries à Gram positif et plus spécifiquement chez les streptocoques et les entérocoques du fait de leur grand nombre d'allèles (4 ou 5 allèles) (Isnard *et al.* Données non publiées; Leclercq 2002; Depardieu et Courvalin 2001; Tait-Kamradt *et al.* 2000). Ces mutations confèrent alors à la bactérie un phénotype de résistance de type MLS_B et ML.

Un autre site de modification de la cible ribosomale a clairement été établi. Il s'agit de mutations au sein de la séquence nucléotidique des gènes *rplD* et *rplV* codant respectivement pour les protéines ribosomales L4 et L22. Ces mutations apparaissent généralement dans une partie protéique de 32 acides aminés très conservés au sein des espèces bactériennes.

Ces protéines forment avec les domaines I à V de l'ARNr 23S la surface du tunnel dans lequel le peptide néosynthétisé avance au cours de la traduction (Nissen *et al.* 2000). Ces mutations confèrent à la bactérie une résistance aux macrolides pour L4 et aux streptogramines pour L22 et ont été rapportées chez de nombreuses espèces dont *S. pneumoniae* (Cattoir *et al.* 2007; Leclercq et Courvalin 2002; Tait-Kamradt *et al.* 2000).

4.9.2. Résistance aux MLS par inactivation enzymatique

Plusieurs enzymes sont capables d'inactiver les MLS en modifiant la structure chimique de l'antibiotique, ce qui aura pour conséquence la non fixation de l'antibiotique sur son substrat. La synthèse d'une enzyme donnée ne va affecter que les molécules de structure apparentée au sein du groupe MLS. Les molécules de la famille des macrolides peuvent être

modifiées par des estérases, qui vont dégradées le cycle macrolactonique de la molécule antibiotique. Ces enzymes sont codées par les gènes *ere(A)* ou *ere(B)*. Les macrolides peuvent aussi être transformés par l'action de phosphotransférases codées par les gènes *mph* (Nakajima 1999). Les lincosamides peuvent être inactivés par des nucléotidyltransférases codées par les gènes *lnu* (anciennement appelés *lin*). C'est chez *Staphylococcus haemolyticus* que le gène *lin(A)* et son homologue *lin(A')*, ensuite dénommés *lnu(A)*, ont été mis en évidence pour la première fois (Brisson-Noël *et al.* 1988; Brisson-Noël et Courvalin 1986). Ces enzymes génèrent une nucléotidylation du groupement hydroxyl en position 3 des lincosamides. Actuellement, 9 gènes appartenant à ce groupe ont été décrits (Gravey *et al.* 2013; Roberts *et al.* 1999). Les lincosamides peuvent aussi être modifiés par des phosphotransférases codées par certains gènes *mph*. Chez *E. faecium*, on retrouve généralement le gène *lnuB* comme déterminant de résistance à la lincomycine (Bozdogan *et al.* 1999). La résistance aux streptogramines est fréquemment expliquée par l'association d'enzymes codées par les gènes *vat* et *vgb*. Les gènes *vat* codent pour des acétyltransférases touchant les streptogramines A, les rendant ainsi inactives et abolissant ainsi la synergie observée avec les streptogramines B (Allignet *et al.* 1996). Chez *E. faecium*, se sont les acétyltransférases *Vat(D)* et *Vat(E)* qui sont les plus prévalentes (Werner *et al.* 2003). Les gènes *vgb* quant à eux codent pour des lactonases qui vont hydrolyser le macrocycle lactonique des streptogramines B. Ce mécanisme a été décrit en premier lieu chez les espèces du genre *Staphylococcus* avant que les protéines *Vgb(A)* et *Vgb(B)* soient décrites chez *E. faecium* (Korczynska *et al.* 2007; Bozdogan et Leclercq 1999).

4.9.3. Résistance aux MLS par efflux actif

Les systèmes d'efflux sont des composés majeurs dans la résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Actuellement, 5 groupes majeurs de pompes d'efflux sont référencés, i) la famille des RND (« *Resistance-Nodulation-cell Division* »), ii) la famille des MFS (« *Major*

Facilitator Superfamily »), iii) la famille des protéines MATE (« *Multidrug And Toxic compound Extrusion* »), iv) la famille des AcrAb-TolC et enfin v) la famille des protéines ABC (« *ATP-Binding Cassette* ») (Guérin *et al.* 2016; Putman *et al.* 2000; Nikaido 1996). Chez les bactéries à Gram négatif, c'est le système tripartite AcrAB-TolC, codé par l'opéron *acrAB-tolC*, qui est le plus souvent rencontré dans la résistance à divers xénobiotiques (Li *et al.* 2015; Pos 2009; Nikaido 1996).

Il existe cependant d'autres pompes intrinsèques au sein des génomes bactériens, qui ont pour propriété de participer à l'excrétion et donc à la résistance aux composés hydrophobes, comme les macrolides. Ces pompes appartiennent dans la majeure partie des cas à la famille des RND. Cette famille est composée de 3 protéines (« *inner membrane protein* » (IMP), « *periplasmic membrane fusion protein* » (MFP) et « *outer membrane protein* » (OMP)). Chez les bactéries à Gram positif, l'apparition d'une résistance par efflux est principalement due à deux classes de pompes que sont les MFS et les protéines ABC. Chez les streptocoques et particulièrement chez *S. pneumoniae* et *S. pyogenes*, la résistance aux macrolides par efflux est médiée par une protéine codée par le gène *mef(A)*. Ce gène est également retrouvé dans divers espèces de streptocoques (oraux, streptocoques du groupe C ou G, *S. agalactiae*) mais aussi chez les entérocoques de façon plus anecdotique. Le gène *mef(A)* a initialement été détecté chez *S. pyogenes* et un homologue de ce dernier appelé initialement *mef(E)* chez *S. pneumoniae* (Tait-Kamradt *et al.* 1997; Clancy *et al.* 1996). Ce gène *mef(A)* code pour une pompe à protons appartenant à la famille des MFS, responsable de l'apparition d'un phénotype de résistance de type M, où seule l'activité des macrolides à 14 et 15 est réduite (Leclercq 2002). Il est à noter que cette résistance est transférable par conjugaison et qu'elle peut être portée par des éléments génétiques mobiles de type transposons chez *S. pneumoniae* (Santagati *et al.* 2000).

Chez les bactéries du genre *Staphylococcus*, la résistance par efflux aux macrolides est médiée par une protéine de la famille des protéines ABC, codée par le gène plasmidique *msr(A)*. Ce gène a été mis en lumière pour la première fois chez *Staphylococcus epidermidis*, mais a depuis été retrouvé chez de nombreuses autres espèces de staphylocoques dont des souches de *S. aureus* (Schmitz *et al.* 2000). Le gène *msr(A)* induit l'apparition d'une résistance inductible aux macrolides à 14 et 15 atomes et non inductible aux streptogramines B. Chez *E. faecium*, le gène codant pour la protéine Msr(C) a également été rapporté (Arias et Murray 2012). Les lincosamides ne sont pas touchés par ce génotype de résistance et ne sont pas inducteurs de ce dernier (Ross *et al.* 1996, 1990). D'autres protéines ayant une forte homologie avec Msr(A) ont également été décrites et sont elles aussi responsables d'une résistance isolée aux macrolides (Roberts *et al.* 1999).

Une autre protéine, appartenant toujours à cette famille des protéines ABC, a également été décrite sur un plasmide acquis par les staphylocoques. Cette protéine, codée par le gène *vga(A)* confère un bas niveau de résistance aux lincosamides et un haut niveau de résistance aux streptogramines A et aux pleuromutilines (Gentry *et al.* 2008; Chesneau *et al.* 2005; Allignet *et al.* 1992).

Enfin, certaines bactéries comme *E. faecalis* sont naturellement résistantes aux lincosamides et aux streptogramines A (phénotype LS_A). Cette résistance est liée à la présence d'un gène chromosomique *lsa(A)* qui code pour la protéine Lsa(A) structurellement apparentée aux protéines ABC (Singh *et al.* 2002) et qui présente environ 40% d'homologie avec Vga(A) et Msr(A). Cette résistance naturelle, est également retrouvée chez toutes les espèces d'entérocoques sauf *E. faecium*, *E. hirae* et *E. durans*. Plus récemment, d'autres protéines apparentées à la famille des protéines ABC et proches de Lsa(A), ont été décrites chez *S. sciuri* (Lsa(B)) (Kehrenberg *et al.* 2004), chez *S. agalactiae* (Lsa(C)) (Malbruny *et al.* 2011) et chez *E. faecium* (Lsa(E)) (Li *et al.* 2014).

4.10. Résistance aux tétracyclines et aux glycylyclines

Les antibiotiques de la famille des tétracyclines sont apparus à la fin des années 1940 avec la découverte de la chlortétracycline et de l'oxytétracycline (Chopra et Roberts 2001). Ces molécules ont été extraites à partir de souches de *Streptomyces aureofaciens* et *Streptomyces rimosus*. Dès lors, un grand nombre de molécules, soit d'origine naturelle (tétracyclines et dérivés au sens large), soit hémisynthétiques (minocycline, doxycycline), vont faire leur apparition. Les molécules les plus récentes, dites de 3^{ème} génération, sont des molécules hémisynthétiques classées dans le groupe des glycylyclines comme la tigécycline (Figure 19). La tigécycline est un dérivé de la minocycline (9-*t*-butylglycylamido-minocycline) ayant une activité bactériostatique sur un grand nombre de germes à Gram positif mais aussi à Gram négatif (Noskin 2005; Chopra 2001). La tigécycline est approuvée par la FDA dans le traitement des infections de la peau et des tissus mous compliquées et intraabdominales à bactéries à Gram négatif mais aussi à Gram positif comme les SARM et les ERV (Babinchak *et al.* 2005; Ellis-Grosse *et al.* 2005; Noskin 2005).

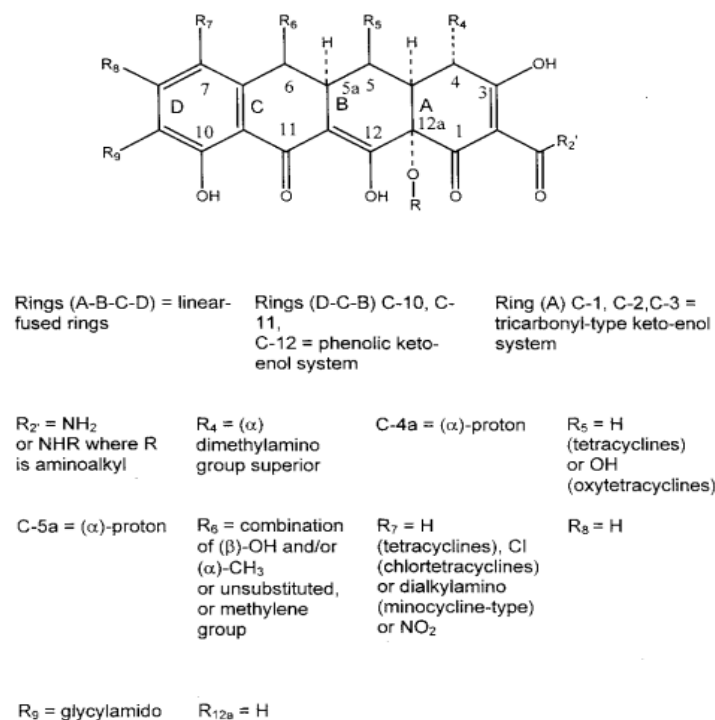


Figure 19. Structure chimique et modifications conformationnelles des tétracyclines (Chopra et Roberts, 2001)

Les tétracyclines inhibent la synthèse protéique en interférant de façon réversible avec la sous-unité 30S du ribosome et plus précisément avec l'ARNr 16S et la protéine ribosomale S7. Cette interaction empêche l'ancrage du site accepteur des ARNt (aminoacyl-ARNt) sur le ribosome et bloque ainsi l'étape d'élongation peptidique (Chopra et Roberts 2001; Schnappinger et Hillen 1996). La tigécycline possède le même mécanisme d'action que les tétracyclines mais présente une affinité accrue pour la cible ribosomale (Bauer *et al.* 2004). La résistance aux tétracyclines est causée par de très nombreux déterminants génétiques mais repose sur 2 principaux mécanismes, i) efflux actif de l'antibiotique et ii) protection ribosomale (Miller *et al.* 2014). Chez *E. faecium*, l'efflux actif responsable de cette résistance est principalement médié par les gènes *tet(K)* et *tet(L)*, deux gènes plasmidiques largement diffusés, codant pour des protéines appartenant à la famille des pompes MFS et dont le domaine transmembranaire est composé par une structure à 14 hélices- α , conférant une

résistance à toutes les molécules de la famille des tétracyclines excepté la minocycline (Chopra et Roberts 2001). L'expression de cette résistance est régulée par un phénomène d'atténuation traductionnelle en l'absence d'antibiotique dans le milieu environnant (Schwarz *et al.* 1992). D'autres gènes appartenant à la famille des gènes *tet* sont également retrouvés chez *E. faecium*. En effet, les gènes *tet(M)*, *tet(O)* et *tet(S)* sont les plus prévalents chez *E. faecium*. Ces gènes sont d'origine chromosomique, confèrent une résistance complète aux tétracyclines mais aussi à la minocycline et à la doxycycline et sont transférables horizontalement via un transposon de type Tn916 (Bentorcha *et al.* 1991; Pepper *et al.* 1987). Ces protéines possèdent une forte homologie de séquence avec les facteurs d'élongation bactériens et tout comme ces derniers, sont capables d'hydrolyser le GTP et en présence du ribosome, en changer sa conformation et ainsi empêcher l'ancrage des tétracyclines. Ces différents déterminants de résistance affectent les tétracyclines tandis que les glycylicyclines, du fait de leur grande affinité pour le ribosome, ne sont pas ou peu affectées par ces derniers (Fluit *et al.* 2005). Jusqu'à présent, la résistance à la tigécycline semblait être sous l'influence d'un mécanisme d'efflux médiée par différents types de pompes. En effet, chez *E. coli*, la diminution de sensibilité est liée à la surexpression d'une pompe AcrAb-TolC sous la dépendance d'un régulateur transcriptionnel de type MarA (Keeney *et al.* 2008). Cette diminution de sensibilité est également liée à la surexpression d'opérons codants pour des pompes de la famille RND chez d'autres espèces d'entérobactéries comme *Enterobacter cloacae* complex ou *K. pneumoniae*, mais aussi chez *Acinetobacter baumannii* (Guérin *et al.* 2016; Sun *et al.* 2013; Veleba *et al.* 2012). Chez les bactéries à Gram positif, la résistance à la tigécycline est exceptionnelle. La diminution de sensibilité à la tigécycline a été décrite *in vitro* chez *S. aureus* et comme précédemment serait liée à la surexpression du gène *mepA*, codant pour une pompe d'efflux de la famille MATE (McAleese *et al.* 2005). Peu d'isolats d'entérocoques de sensibilité diminuée à la tigécycline ont été décrits jusqu'à présent (Werner

et al. 2008). Cependant, des travaux récents ont conclu que la résistance à la tigécycline chez *E. faecium* pourrait être médiée par un phénomène de surexpression de gène de type *tet* porté sur un plasmide à haut niveau de copies (Fiedler *et al.* 2016). Nous présenterons la première description génomique de la résistance aux glycylicyclines chez *E. faecium* dans la partie « résultats » de ce manuscrit.

5. Les « ATP-Binding Cassette » protéines

Les protéines ABC constituent une des plus grandes superfamilles de séquences paralogues et sont retrouvées à la fois chez les eucaryotes et chez les procaryotes (Beis 2015). Au début des années 2000, une étude globale sur les protéines ABC recensée environ 600 protéines appartenant à cette famille (Dassa et Bouige 200). Cette superfamille protéique est divisée en trois grandes catégories d' effecteurs:

i) **Les systèmes d'exports** : ubiquitaires puisque retrouvés aussi bien chez les eucaryotes (protéine CFTR impliquée dans la mucoviscidose, ou P-gp impliquée dans la multirésistance aux anticancéreux) et les procaryotes, les transporteurs ABC appartenant à ce groupe sont impliqués dans l'excrétion de diverses molécules de nature peptidique, lipidique, polysaccharidique, et même protéique (toxines) et permettent la détoxification cellulaire. Ces systèmes sont regroupés sous le terme générique de transporteurs ABC de classe I (Ian D. Kerr *et al.* 2010).

ii) **Les systèmes d'import** : propres aux procaryotes (Kos et Ford 2009), ces systèmes permettent la capture au niveau cytoplasmique de divers nutriments ou métabolites essentiels à la survie des organismes unicellulaires. Ils sont généralement composés par 4 polypeptides différents associés à une protéine de liaison du substrat extracytoplasmique. Les protéines appartenant à ce groupe sont dites, transporteurs ABC de classe III.

iii) **Les systèmes non impliqués dans le transport** : cette troisième catégorie de protéines ABC regroupe des protéines qui seraient impliquées dans la réparation de l'ADN ou la traduction des ARNm ainsi que dans l'élongation de la traduction protéique. Ces protéines sont regroupées dans les protéines ABC de classe II. Certaines protéines de la classe III chez lesquelles aucun domaine de fixation membranaire n'est retrouvé sembleraient aussi ne pas jouer de rôle dans l'import de molécules.

Les protéines appartenant à la famille des systèmes ABC jouent un rôle essentiel dans la physiologie bactérienne et tout évènement entravant leur bon fonctionnement peut entraîner des conséquences dramatiques dans le fitness bactérien. Un grand nombre de protéines ABC semblent être essentielles dans les processus physiologiques des bactéries mais peuvent aussi être impliqués dans les processus de virulence et de pathogénicité de ces dernières (Henderson et Payne 1994). En complément de leur importance dans le transport de diverses molécules, les protéines ABC sont aussi impliquées dans la régulation de divers processus physiologiques (Davidson *et al.* 2008).

5.1. Structure et fonctions des protéines ABC

De manière générale, les protéines ABC se composent de deux domaines cytoplasmiques hydrophiles (« *Nucleotide-Binding Domain* », NBD), capables de se fixer à l'ATP, de l'hydrolyser et ainsi permettre de coupler l'énergie de cette hydrolyse à une fonction physiologique, et de deux domaines hydrophobes transmembranaires (« *TransMembrane Domain* », TMD) (Figure 20) couplés aux NBDs et ayant un rôle important dans la reconnaissance et le transport du substrat. Ces derniers sont généralement composés de 6 segments transmembranaires en hélice α (Linton 2007; Jones et George 1999).

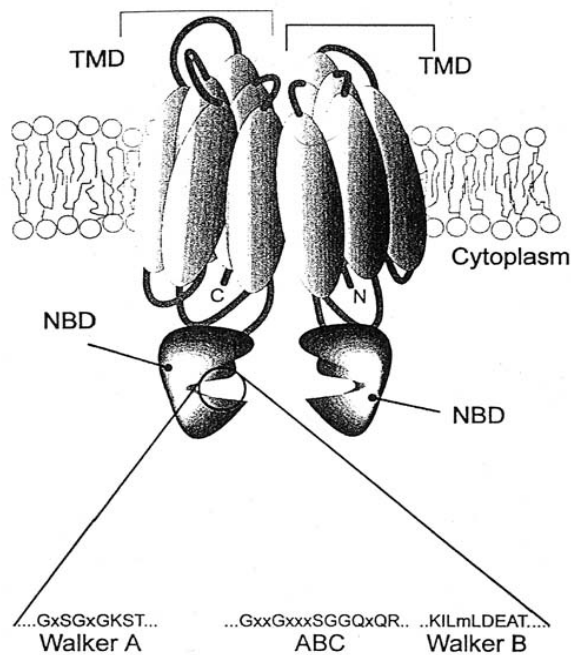


Figure 20. Organisation générale des protéines ABC et motifs conservés d'un domaine NBD (van Veen et Konings 1997). Les deux domaines transmembranaires (TMD) sont chacun constitués de 6 hélices α membranaires. Les domaines de fixation des nucléotides (NBD) sont situés du côté cytoplasmique de la membrane et contiennent les motifs conservés impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP (motifs Walker A et Walker B, motif Signature). Les résidus les plus conservés de ces motifs sont indiqués.

Alors que l'homologie de séquences protéiques pour les TMD est très faible, les protéines appartenant à la famille des protéines ABC partagent une séquence consensus hautement répétée au niveau des NBD. Cette séquence, d'environ 215 acides aminés, est composée des motifs conservés suivants (Oldham *et al.* 2008; Davidson *et al.* 2008) (Figure 21) : i) le motif Walker A, également appelé « P-loop », région riche en glycines. Son motif consensus est : GXXGXGK(S/T) (X représente un acide aminé divers), ii) le motif Walker B, région hydrophobe avec quelques acides aminés chargés. Son motif consensus est : ILLD(D/E/S). Ces deux motifs sont communs à toutes les protéines fixant des nucléotides triphosphates. iii) le motif Signature, également appelé « C-loop », dont la séquence est LSGGQ(Q/R/K)QR. Ce motif est spécifique des protéines ABC et les distingue des autres ATPases. iv) la région

Switch, située après le motif Walker B, et dans laquelle se trouve une histidine conservée à 90 % (H loop). v) une région Centre, située entre les motifs Walker A et Walker B, qui contient une glutamine et une arginine très conservées (Q-loop).

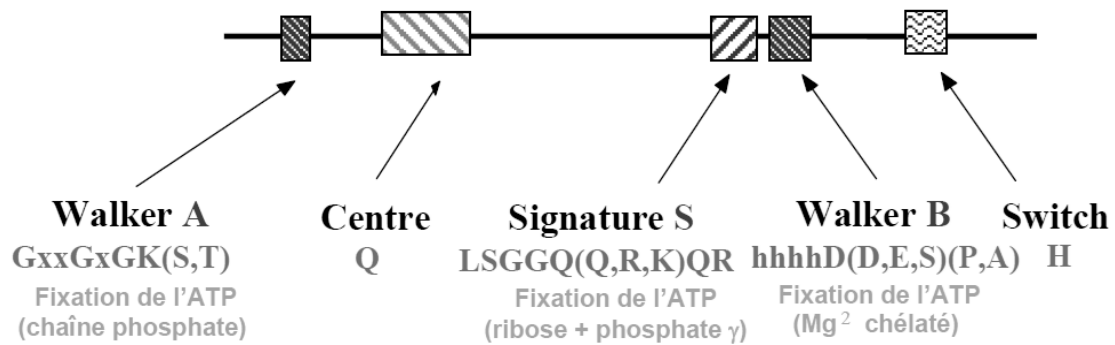


Figure 21. Représentation schématique et organisation d'un domaine liant les nucléotides (NBD) des protéines ABC (Davidson *et al.* 2008). Les motifs Walker A et B sont distants d'environ 110 acides aminés. La signature ABC précède le motif Walker B de 20 acides aminés. Les acides aminés les plus conservés dans ces motifs sont indiqués au-dessous.

L'organisation minimale d'une protéine ABC est variable selon le rôle de ce dernier. En effet, les transporteurs ABC de classe I, responsables de l'export de divers métabolites ou drogues, de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule, sont formés par la fusion d'un NBD et d'un TMD. Les transporteurs ABC de classe III, responsables de l'import de nutriments et autres molécules d'intérêt pour la cellule procaryote, sont eux formés, par l'assemblage de 4 polypeptides différents associés à une protéine extra-cytoplasmique qui permet de capter le substrat. Enfin les protéines ABC de classe II, qui ne seraient pas responsables de mécanismes de transports, sont quand à elles formées par une protéine hydrophile composée par deux domaines NBD répétés en tandem, fusionnés et qui ne sont pas couplés avec un ou plusieurs domaines transmembranaires (Davidson *et al.* 2008). Les protéines ABC de classe II

présentent donc les motifs de NBD en double, soit deux domaines Walker A, deux domaines Walker B et ainsi de suite.

Cependant, certains auteurs émettent l'hypothèse selon laquelle, ces protéines s'associent à un domaine transmembranaire préexistant, afin de former un système d'efflux fonctionnel (Kerr *et al.* 2010; Kerr *et al.* 2005).

5.2. Les protéines ABC de classe II ayant un rôle dans l'antibiorésistance

Au sein du groupe des protéines ABC de classe II, une sous-famille de protéines est relativement importante en terme d'antibio-résistance. Cette sous-famille baptisée ARE (pour Antibiotics Resistance Elements), regroupe des protéines impliquées dans la résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramines A.

Les transporteurs ABC bactériens impliqués dans la résistance aux antibiotiques, ont pour la plupart été identifiés dans un premier temps chez les organismes producteurs d'antibiotiques comme les streptomycètes permettant à ces derniers d'échapper à l'action létale de l'antibiotique sur ces derniers (Cudliffe 1989). Par la suite, de nombreux homologues, impliqués dans la résistance ont été retrouvés dans des isolats bactériens en médecine humaine, ce qui soulève la question de l'origine de la résistance à certains antibiotiques.

Ces protéines ABC de classe II sont généralement impliquées dans la résistance bactérienne aux MLSP. Parmi ces protéines ARE, on retrouve Msr(A) et Vga(A), protéines les plus étudiées, toutes deux codées par des déterminants génétiques retrouvés sur des éléments génétiques mobiles chez les staphylocoques (Ross *et al.* 1995; Allignet *et al.* 1992). D'autres protéines responsables de résistance aux MLS, appartiennent à cette classe de protéines ARE. C'est le cas de la protéine Lsa(A), codée par le gène *lsa(A)*, responsable de la résistance naturelle aux lincosamides et streptogramines A chez *E. faecalis* (Singh *et al.* 2002;

Dina *et al.* 2003) ou de Lsa(C), codée par le gène *lsa(C)*, responsable de la résistance acquise LS_AP chez *S. agalactiae* (Malbruny *et al.* 2011) ou Lsa(B) et Lsa(E) responsables d'un phénotype LS_AP chez *Staphylococcus* spp. (Li *et al.* 2014; Wendlandt *et al.* 2013).

Cependant, le mécanisme biochimique de la résistance causée par ces protéines ABC de classe II, hypothétiquement un efflux, reste à prouver. En effet, aucune étude n'a déterminé le mécanisme moléculaire de résistance dû aux représentants de la famille des ARE et à identifier des partenaires membranaires qui, en association avec ces protéines, permettraient l'efflux des substances antibiotiques (Reynolds *et al.* 2003; Ross *et al.* 1995). Au cours de ce travail, nous avons pu montrer, que la substitution d'un acide aminé au sein d'une protéine apparentée aux protéines ABC de classe II était responsable, chez *E. faecium*, de l'apparition d'une résistance croisée aux MLS et pleuromutilines. Les résultats obtenus seront développés plus tard dans ce manuscrit.

6. Impact des xénobiotiques non-antibiotiques sur la physiologie bactérienne

Contrairement aux antibiotiques dont les effets sur la physiologie des cellules bactériennes sont très largement documentés dans la littérature, les connaissances concernant l'impact des substances non-antibiotiques sur les pathogènes bactériens sont, elles, peu développées. Alors que plus de 70% des patients hospitalisés dans les unités de soins intensifs et réanimations reçoivent des antibiotiques (en traitement préventif ou curatif), d'autres molécules thérapeutiques n'appartenant pas à la famille des antimicrobiens sont aussi très largement utilisées chez tous ces patients, comme les catécholamines, les analgésiques, les anxiolytiques, les anticoagulants, les antiacides, les curarisants ou encore les antifongiques (Smythe *et al.* 1993).

Les premières études consacrées à l'impact des molécules non-antibiotiques sur le fitness bactérien remontent au début du 20^{ème} siècle et l'introduction de l'adrénaline en médecine humaine. En effet, rapidement après les premières utilisations thérapeutiques de cette catécholamine, des cas d'infections gravissimes furent rapportés et en particulier des épisodes de gangrène gazeuse chez des patients sans comorbidités, ni infections associées (Cooper 1946). Il a été alors observé qu'en présence de taux thérapeutiques d'adrénaline, la dose infectante nécessaire de *Clostridium perfringens* était diminuée d'environ 4 logs (Cooper 1946). Du fait de l'expansion de l'utilisation de dispositifs stériles et unitaires dès la fin des années 1950, les descriptions de cas rapportant l'interaction entre bactérie et xénobiotiques non-antibiotiques ont quasiment disparu de la littérature scientifique (Lyte 2004). La théorie de la communication entre bactéries et hormones humaines émergera de nouveau dans les années 1980 lors de la découverte de la synthèse d'un homologue à l'insuline chez *E. coli* K12 (Lenard 1992; LeRoith *et al.* 1981). Dès lors, plusieurs études vont démontrer que ces

molécules non-antibiotiques semblent avoir un rôle non négligeable sur la virulence et la résistance aux antimicrobiens chez certains pathogènes retrouvés chez l'homme ou l'animal mais aussi influencent fortement la composition du microbiote humain (Maurice *et al.* 2013).

En effet, grâce à des essais *in vitro* de virulence et des modèles *ex vivo* d'infections, il a été démontré que l'administration de catécholamines jouait un rôle important chez *Pseudomonas aeruginosa*, en favorisant sa croissance, la production de biofilm et en permettant une meilleure survie en cas d'administration de tobramycine (antibiotique de la famille des aminosides) (Freestone *et al.* 2012). En utilisant un modèle murin de colonisation de l'intestin par *P. aeruginosa* et des essais *in vitro*, il a été aussi démontré que l'utilisation de la morphine était responsable d'une plus grande mortalité. En effet, l'utilisation de cette molécule induirait l'apparition d'un phénotype plus virulent de la souche de *P. aeruginosa* (Babrowski *et al.* 2012). A partir d'une analyse transcriptomique, confirmée par des tests fonctionnels, il a aussi été rapporté que l'utilisation de norépinéphrine, un dérivé des catécholamines jouant le rôle de neurotransmetteur dans le système sympathique et largement synthétisée au niveau du tractus intestinal humain en cas de stress, influait sur la voie du *quorum-sensing* par l'intermédiaire du gène *las* et améliorerait la croissance, la mobilité, l'adhésion et augmenterait la virulence de *P. aeruginosa*. L'augmentation de la virulence après exposition aux catécholamines a aussi été rapportée chez d'autres espèces bactériennes, comme *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Campylobacter jejuni*, *S. epidermidis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Brachyspira pilosicoli* et *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Li *et al.* 2012; Naresh et Hampson 2011; Anderson et Armstrong 2008; Karavolos *et al.* 2008; Bansal *et al.* 2007; Cogan *et al.* 2007; Dowd 2007; Green *et al.* 2004; Chen *et al.* 2003; Lyte *et al.* 2003). Une des explications avancées pour comprendre l'interaction entre les bactéries entériques comme *E. coli* et l'augmentation de leur virulence et de leur adhésion en présence de catécholamines, est la mise en évidence d'un récepteur adrénergique bactérien, le système

à deux composants QseBC et plus spécifiquement la protéine QseC (Clarke *et al.* 2006). En effet, ce système à deux composants serait un régulateur du *quorum-sensing* et agirait ainsi sur un grand nombre de gènes de virulences chez *E. coli*, expliquant ainsi l'interaction existante entre les catécholamines et la virulence de certaines souches (Sperandio *et al.* 2002). Tout récemment, des travaux ont aussi rapportés un impact de la norépinéphrine sur le taux de particules virales infectieuses des virus *Herpes simplex virus-1* (HSV-1) et *Herpes simplex virus-2* (HSV-2) au niveau des neurones sympathiques de patients porteurs (Ives et Bertke 2017).

De façon tout à fait intéressante, il a aussi été démontré que les catécholamines favorisaient le transfert « horizontal » de gènes par conjugaison des bactéries retrouvées au niveau intestinal, et donc par la même, permettaient une dissémination des déterminants de virulence mais aussi de résistance entre différentes espèces bactériennes (Peterson *et al.* 2011).

Une autre classe de molécules thérapeutiques a été rapportée comme ayant un impact sur la physiologie bactérienne. En effet, contrairement aux études précédentes dont les résultats convergent vers des effets « bénéfiques » pour la cellule bactérienne, l'utilisation de midazolam (molécule anxiolytique de la famille des benzodiazépines) augmenterait, indépendamment de son effet anxiolytique, le taux de survie de souris utilisées dans un modèle de sepsis et de plaies secondaires à des brûlures, infectées par *P. aeruginosa* (Dugan *et al.* 2010).

Enfin, des travaux portant sur l'effet de la caspofungine, molécule antifongique de la classe des échinocandines (Figure 22) sur *S. aureus* ont été réalisés par Siala *et al.*

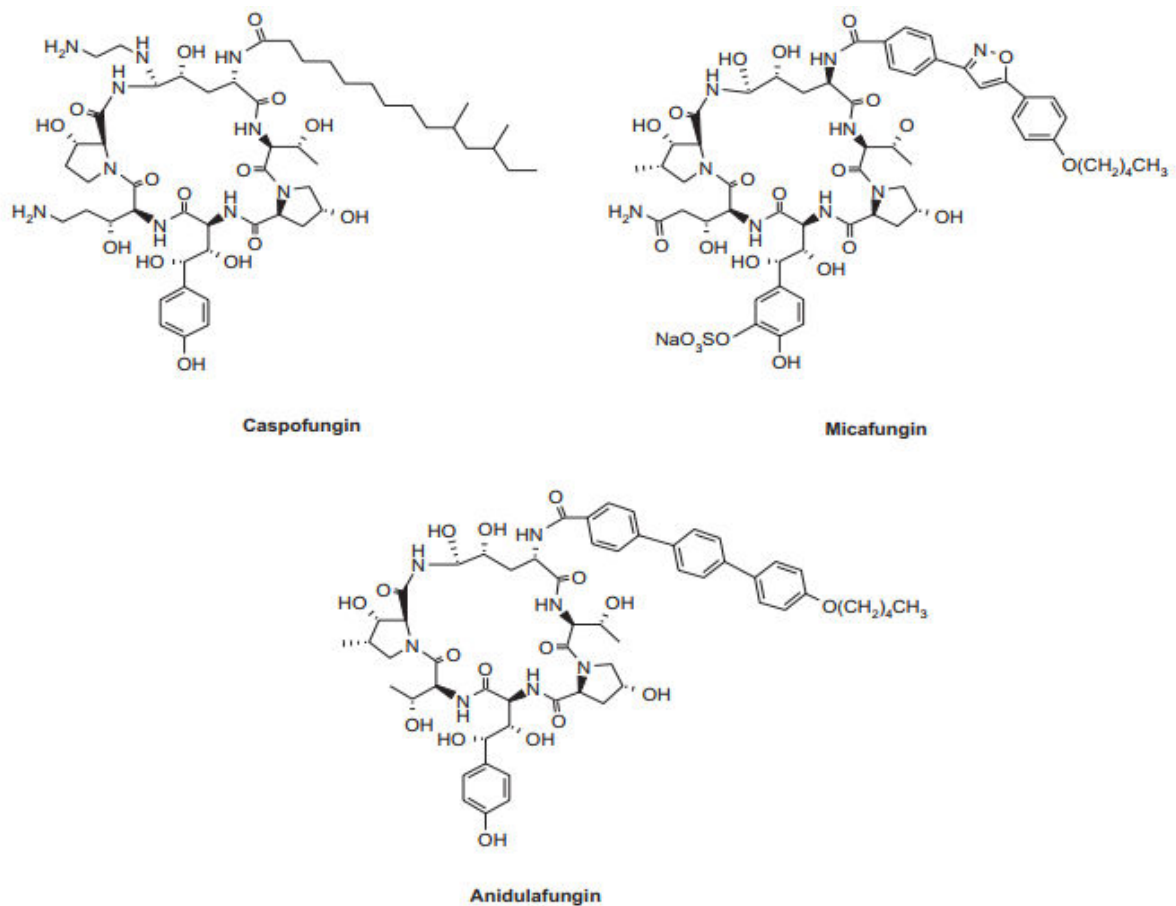


Figure 22. Structure chimique des échinocandines, caspofungine, micafungine et anidulafungine (Georgopadakou, 2001).

La caspofungine, comme tous les représentants de la famille des échinocandines, est un antifongique fongicide ayant une forte activité anti-biofilm, inhibant la synthèse de certains constituants essentiels de la paroi fongique. Elle a pour cible la β -(1,3)-glucane-synthétase, enzyme strictement retrouvée chez les protistes fongiques, impliquée dans la synthèse des glucanes, dont elle inhibe l'action (Georgopadakou 2001) (Figure 23).

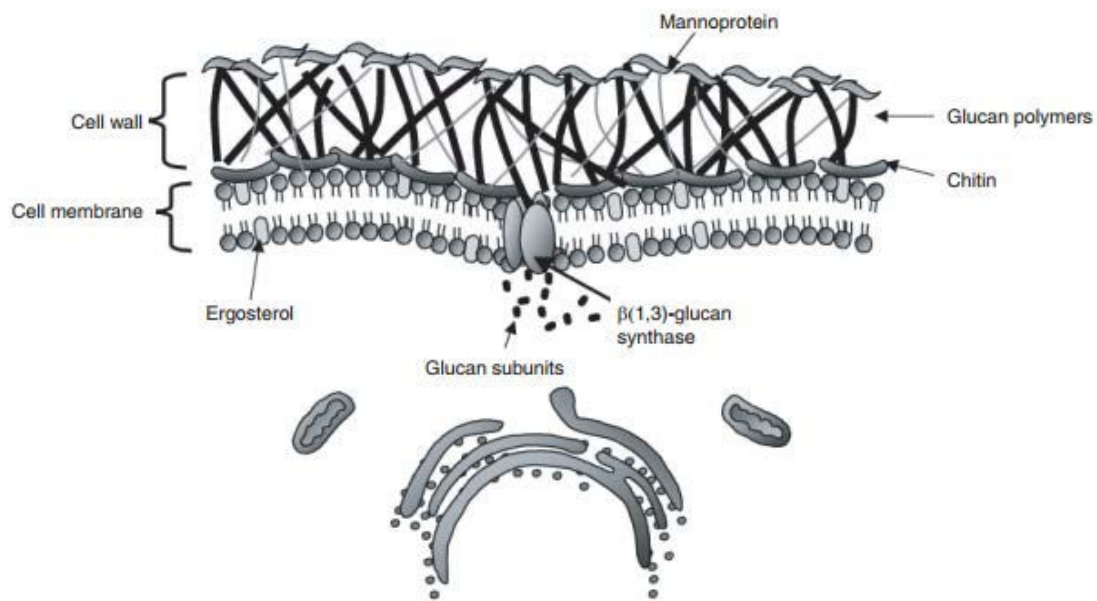


Figure 23. Organisation de la membrane cellulaire et de la paroi fongique (Wiederhold et Lewis 2003).

Dans leurs travaux, Siala *et al.* ont pu démontrer que la caspofungine agissait de façon synergique avec les fluoroquinolones sur la formation de biofilms de *S. aureus* en inhibant une enzyme, la *N*-acetylglucosamine transferase (IcaA) codée par un gène appartenant à l'opéron *ica* (Siala *et al.* 2016).

Les résultats de ces différentes études et observations montrent que les molécules non-antibiotiques influencent de façon significative la capacité de la cellule bactérienne à persister et à proliférer, mais aussi influenceraient la virulence et l'échange de déterminants génétiques impliqués dans la résistance. Devant ces différentes constatations, une évaluation de l'impact des molécules non-antibiotiques les plus prescrites dans les services de soins intensifs et les services de réanimations sur un des principaux pathogènes nosocomiaux rencontré, *E. faecium*, sera abordée plus tard dans la partie résultats de ce manuscrit.

7. Cancer et Microbiote intestinal : un lien inattendu

7.1. Le microbiote intestinal

Lorsque les micro-organismes entretiennent une relation mutualiste avec l'hôte qui les héberge, on parle de relation hôte-pathogène commensale. Les micro-organismes commensaux occupent la totalité des barrières naturelles de l'hôte avec un nombre de bactéries présentes chez l'homme estimé à 10^{12} au niveau cutané, 10^{10} au niveau de la cavité orale et 10^{14} au niveau du tractus digestif (Dave *et al.* 2012). D'un point de vue génomique, le microbiome bactérien (métagénome intestinal) serait environ 100 fois plus important que le génome humain qui l'héberge (Maynard *et al.* 2012; Qin *et al.* 2010). Le microbiote intestinal est un écosystème dynamique composé de champignons, virus, bactériophages mais aussi de bactéries dont les principaux phyla dominants sont les *Firmicutes*, les *Bacteroidetes*, les *Preteobacteria* et les *Actinobacteria* (Dave *et al.* 2012). Cependant, le microbiote n'est pas réparti de façon uniforme d'un point de vue quantitatif mais aussi en termes de diversité bactérienne au sein du tractus digestif. L'estomac héberge environ une centaine de bactéries par gramme de contenu, principalement des bactéries appartenant à la famille des lactobacilles alors qu'au niveau colique, on peut retrouver jusqu'à 10^{12} bactéries par millilitre de contenu avec une très grande diversité bactérienne (Dave *et al.* 2012; Holzapfel *et al.* 1998) (Figure 24). La répartition des phyla bactériens est relativement bien conservée au sein des différents groupes d'individus, même si le microbiote est toutefois assez spécifique de son hôte et peut varier sous l'influence de très nombreux facteurs génétiques mais aussi et surtout environnementaux comme l'alimentation, le mode de vie rural ou urbain, certaines hormones (et en particulier les hormones de stress comme la norépinéphrine) et les xénobiotiques antibactériens ou non (Sommer *et al.* 2017; C. Palmer *et al.* 2007). Ce phénomène permet ainsi de catégoriser le microbiote intestinal en deux types de flores bactériennes, la flore

endogène et la flore transitoire. Depuis des millénaires, les bactéries et leurs hôtes respectifs ont co-évolué afin d’aboutir à une relation mutualiste.

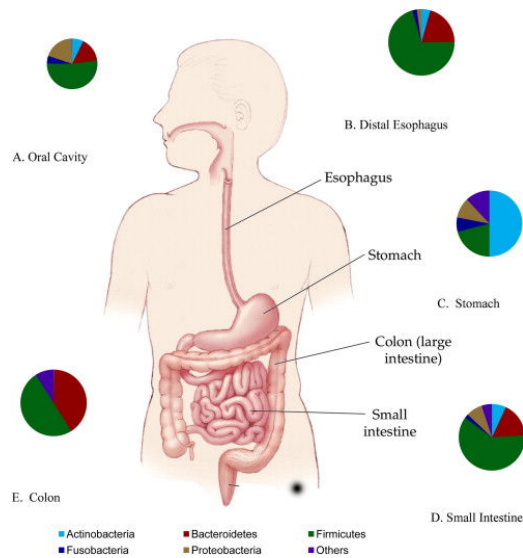


Figure 24. Diversité microbienne et principaux phylums composant le microbiote intestinal (Dave *et al.* 2012).

Les bactéries formant le microbiote intestinal participent ainsi à de nombreuses fonctions physiologiques de l’hôte comme la digestion, la fermentation de certains substrats non assimilables, la synthèse de molécules essentielles à l’hôte (Vitamine K par exemple) ou encore la colonisation de certaines niches jouant alors le rôle de barrière physiologique empêchant l’implantation de bactéries pathogènes (Dave *et al.* 2012). De plus, il est clairement démontré dorénavant que le microbiote intestinal participe au bon développement et à la maturation du système immunitaire en stimulant la production d’immunoglobulines (Vétizou *et al.* 2016; Gaboriau-Routhiau et Cerf-Bensussan 2016). Il est donc clairement établi que le microbiote influence largement la santé de l’hôte.

Désormais le lien entre cancer et micro-organismes est clairement établi puisqu'environ 20% des pathologies tumorales seraient liées à la présence d'un agent pathogène comme par exemple *H. pylori* ou *Fusobacterium nucleatum* (Pevsner-Fischer *et al.* 2016). De plus, il a été démontré que la dysbiose intestinale, phénomène généré par divers éléments extérieurs (chimiothérapies, antibiothérapies) peut engendrer la surreprésentation de certaines espèces bactériennes favorisant l'apparition d'un état d'inflammation chronique au niveau intestinal, entraînant une immuno-modulation locale et ayant comme conséquence une augmentation du risque de carcinogénèse (Schwabe et Jobin 2013; Grivennikov *et al.* 2012; Sokol *et al.* 2008). Cependant, l'impact de la dysbiose intestinale sur les cancers non-gastrointestinaux est peu connu à ce jour.

7.2. Microbiote et chimiothérapies anticancéreuses

De nombreuses études ont montré l'impact délétère de plusieurs micro-organismes dans le développement d'une réaction inflammatoire locale entraînant dans certains cas un phénomène de carcinogénèse (Dzutsev *et al.* 2015). Cependant, dès les années 1940, l'idée d'utiliser des agents microbiens dans le traitement des cancers a fait son apparition. En 1946, l'injection intra-tumorale d'un mélange de *S. pyogenes* et de *Serratia marcescens* fut utilisée (Nauts *et al.* 1946). Dès lors, de nombreuses études rapportent l'utilisation de bactéries comme agents anti-tumoraux avec comme exemple le plus illustré l'utilisation du bacille de Calmette et Guérin (*Mycobacterium bovis* BCG) dans le traitement des carcinomes urothéliaux de la vessie non malins (Babjuk *et al.* 2013). Récemment, les travaux de Viaud *et al.*, ont permis de mettre en évidence l'impact du microbiote intestinal dans l'efficacité des chimiothérapies anti-tumorales. Il a été en effet démontré que l'efficacité du cyclophosphamide (CTX), agent alkylant de la famille des moutardes azotées ayant des propriétés anti-angiogéniques et immunomodulatrices (Sistigu *et al.* 2011), est liée en grande partie à sa capacité à entraîner la translocation de certaines bactéries à Gram positif (dont *E.*

hirae) dans les organes lymphoïdes secondaires. Cette translocation est médiée par un des effets secondaires du CTX qui va fragiliser la muqueuse intestinale et permettre la rupture de l'équilibre entre la flore endogène et les cellules de cette dernière. Lors de la translocation des bactéries au niveau des organes lymphoïdes secondaires comme la rate et les ganglions, une réaction immunitaire antibactérienne se déclenche. Cette immunisation entraîne alors la synthèse de plusieurs types de lignées lymphocytaires, i) les lymphocytes effecteurs Th17 (Lymphocytes T helpers) qui vont sécréter de l'IL-17 et de l'interféron (IFN) γ et ii) des lymphocytes mémoires Th1 qui jouent un rôle d'alliés pour les lymphocytes anti-tumoraux dans le contrôle de différents types de tumeurs. Dans l'étude de Viaud *et al.*, il a été démontré que l'utilisation d'antibiotiques à large spectre impactait sévèrement sur l'efficacité anti-tumorale médiée par le CTX dans un modèle murin mais que cette activité était complètement retrouvée lors de l'instillation orale de bactéries à Gram positif dont en particulier *E. hirae* (Viaud *et al.* 2013) (Figure 25). Cette espèce d'entérocoques étant peu retrouvée en pathologie humaine, son pouvoir pathogène est peu connu. Du fait de notre expertise sur les entérocoques, c'est donc naturellement que nous avons été approchés par l'équipe du Pr. Zitvogel afin de caractériser différentes souches d'intérêt et de participer à l'étude concernant l'utilisation d'extraits de *E. hirae* comme oncoprotéomiques.

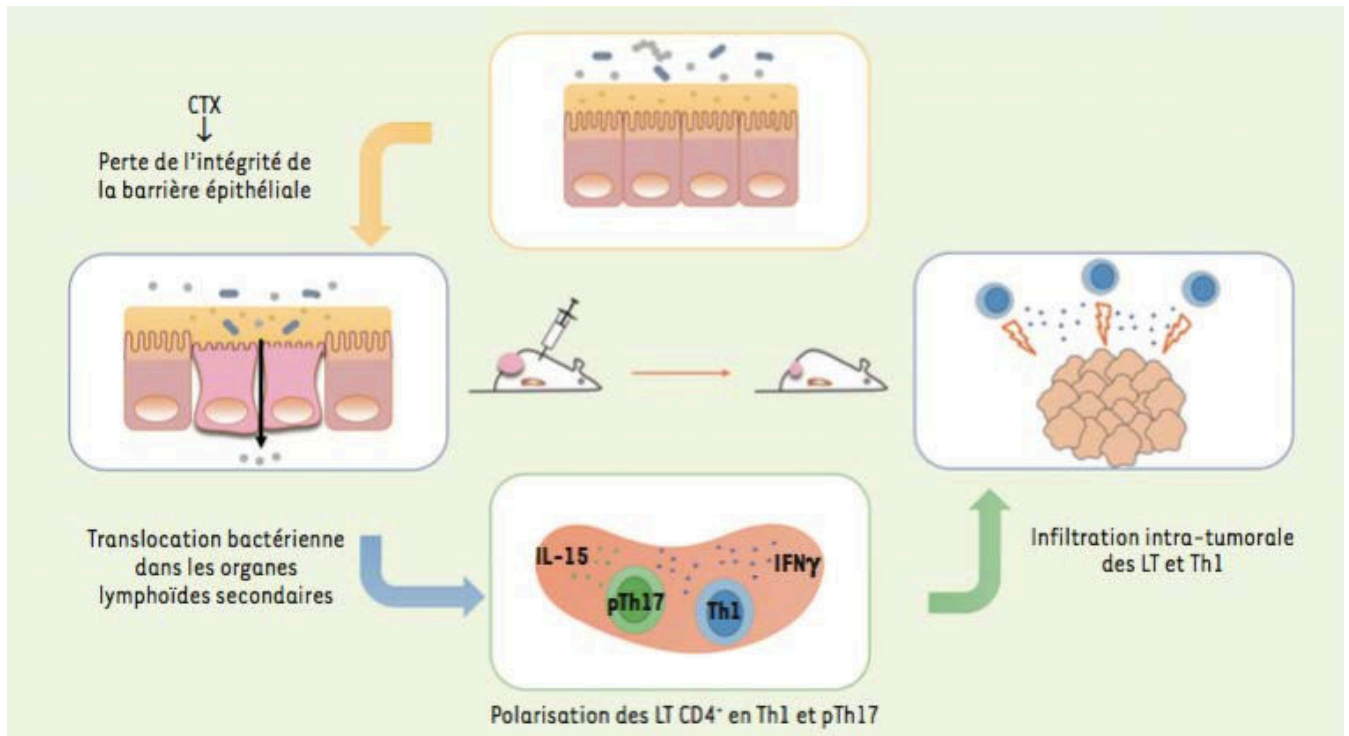


Figure 25. Rôle du microbiote intestinal dans l'activité anti-tumorale du cyclophosphamide (Vétizou *et al.* 2016). Le cyclophosphamide (CTX) va modifier la barrière intestinale et permettre la translocation de bactéries. Certaines bactéries, et plus particulièrement *E. hirae*, vont entraîner la polarisation de lymphocytes T (LT) effecteurs en LT helpers17 et LT helpers 1 au niveau des organes secondaires et induire l'infiltration de lymphocytes Th1 au niveau de la tumeur.

Ces résultats sur l'impact du microbiote dans la réponse aux thérapeutiques anti-cancéreuses a également été confirmé par les travaux de Iida *et al.*, qui ont montré dans un modèle murin que des cellules macrophagiques retrouvées au niveau de tumeurs coliques produisaient des radicaux libres oxydants (RLO) en présence de certaines bactéries commensales du tractus digestif de l'animal. Cette production de RLO induisant des dommages sur l'ADN tumoral et permettant l'éradication des tumeurs en association avec une thérapeutique anti-cancéreuse à base de sels de platine (Iida *et al.* 2013).

Le rôle du microbiote dans la réponse anti-tumorale a également fait l'objet de publications dans des schémas thérapeutiques basés sur l'immunothérapie (Sivan *et al.* 2015; Vétizou *et al.* 2015).

II. OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'objectif principal de cette thèse a été d'étudier les multiples facettes proposées par les bactéries du genre *Enterococcus*. En effet, avec l'avènement de nouvelles technologies moléculaires comme le séquençage à haut débit et ses applications, la nature et le rôle du microbiote chez les patients, ainsi que les impacts des éléments environnementaux sur ce dernier sont désormais des informations beaucoup plus facilement accessibles.

Depuis maintenant une vingtaine d'années, *E. faecium* s'impose comme un des germes les plus prévalent dans les infections liées aux soins. Sa présence au sein du groupe de bactéries « ESKAPE », matérialise son importance clinique et la difficulté thérapeutique à laquelle se confrontent les cliniciens. Cependant toutes les bactéries du genre *Enterococcus* ne sont pas considérées comme pathogènes et pourraient être utilisées dans un but bénéfique comme probiotiques du fait de leur très faible virulence, leur robustesse et leur survie dans l'environnement et leur rôle immuno-modulateur.

Ce constat nous a conduit à dégager trois axes principaux pour ce travail :

Etude de la résistance aux nouvelles molécules utilisées dans le traitement des infections à ERV avec un focus particulier sur deux antibiotiques :

- i) La recherche et la caractérisation de déterminants de résistance responsable de l'apparition d'un phénotype de résistance de type LS_AP chez *E. faecium*. La résistance aux MLSP est médiée par de nombreux déterminants génétiques. Une étude de la littérature existante, rapporte l'existence d'un échec de traitement de trois souches d'*E. faecium* par l'association quinupristine/dalfopristine (Dowzicky *et al.* 2000). De par l'activité de Centre National de Référence (CNR) pour la résistance, laboratoire associé entérocoques, de notre service, nous avons pu obtenir ces souches. La recherche des déterminants de résistance connue à ce jour n'a pas pu permettre d'identifier un gène responsable de l'apparition d'un tel phénotype de résistance. Cette observation nous permet d'envisager

l'existence d'un nouveau phénotype de résistance aux MLSP chez *E. faecium* lié à un nouveau déterminant génétique.

- ii) La recherche et la caractérisation d'un déterminant génétique lié à l'apparition de la diminution de sensibilité à la tigécycline. Aucune donnée concernant la résistance à la tigécycline chez *E. faecium* n'avait été rapportée dans la littérature jusqu'à cette première description.

Impact des xénobiotiques non antibiotiques sur *E. faecium*

E. faecium est un des germes multirésistants particulièrement adapté à l'environnement hospitalier. La grande majorité des souches de *E. faecium* isolées en clinique sont responsables d'infections chez des patients le plus souvent hospitalisés dans des services de réanimation. Lors de son séjour, le patient va recevoir un très grand nombre de molécules thérapeutiques autres que des molécules antibiotiques. L'impact de certaines de ces molécules non-antibiotiques sur quelques espèces bactériennes a déjà été démontré, cependant aucune étude n'a abordé cette problématique avec comme modèle *E. faecium*. En utilisant une analyse phénotypique et transcriptomique, l'impact de ces molécules a été étudié. Le but est ici d'analyser les gènes et les différentes voies métaboliques qui sont impliqués dans l'adaptation de *E. faecium* aux xénobiotiques *a priori* non-antibiotiques.

Rôle de *E. hirae* dans la réponse immunologique anti-cancéreuse lors de l'utilisation de cyclophosphamide (CTX)

Le rôle du microbiote intestinal dans la réponse anti-tumorale lors de traitement anti-cancéreux a déjà été démontré dans la littérature (Zitvogel *et al.* 2017). Lors de travaux récents menés par l'équipe du Pr. Laurence Zitvogel, il a clairement été mis en évidence

l'importance d'un microbiote de bonne composition afin de promouvoir l'activité du CTX mais aussi le rôle central de la translocation dans les organes lymphoïdes secondaires de l'espèce *E. hirae* lors du traitement par CTX afin d'induire la synthèse de lymphocytes effecteurs Th17, cellules immunitaires ayant un rôle anti-tumoral. De part notre activité de CNR, laboratoire associé entérocoques, nous avons été sollicités afin de caractériser divers aspects de cette espèce tant sur le plan de la résistance, de la virulence et de la colonisation chez l'animal. Des travaux de comparaison de génomes bactériens mais aussi de transcriptomique ont également été réalisés dans cette collaboration.

Les données obtenues et présentées dans ce manuscrit sont le fruit de différentes collaborations avec les équipes du Dr. F. Cava (Université de Umeå, Suède), du Pr. L. Zitvogel (INSERM U1015, GRCC, Villejuif), du Dr. Didier Goux (CMAbio, Université de Caen Normandie), de l'équipe de la société ViroScan3D (Lyon, France) et de la société DNAVision (Charleroi, Belgique).

Les résultats obtenus ont fait l'objet de deux communications affichées (JRC 2014, Caen et ECCMID 2016, Amsterdam) ainsi que 3 publications internationales (AAC 2013, AAC 2015 et Immunity 2016). Un 4^{ème} article est en cours de rédaction et devrait être soumis en 2017 (AAC).

III. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Résistance aux antibiotiques chez *E. faecium*

1.1. Publication 1 : Etude de la résistance aux lincosamides, streptogramines A et pleuromutilines (phénotype LS_{AP}) chez *E. faecium*.

Contexte

Alors que les souches d'ERV ont été initialement isolées en Europe il y a 20 ans, les premières épidémies ont été décrites dans les années 1990 aux Etats-Unis où la situation est endémique depuis (Bonten *et al.* 2001). A l'inverse, la situation en France n'est pas endémique mais plusieurs épidémies d'ampleur inhabituelle ont été rapportées dès 2004 (Bourdon *et al.* 2011). Afin de palier au problème d'impasse thérapeutique imposé par l'émergence des souches d'ERV, de nouvelles molécules sont apparues sur le marché lors des deux dernières décennies. Parmi ces molécules, les streptogramines et plus précisément l'association quinupristine-dalfopristine (Q-D), commercialisée sous le nom de marque Synercid[®], est une alternative thérapeutique intéressante et approuvée par la FDA dans le traitement des infections à ERV associées à une bactériémie (Eliopoulos 2003). La résistance à cette catégorie d'antibiotique est le plus souvent médiée par l'acquisition d'un gène *erm* codant pour une méthylase ribosomale, responsable de l'apparition d'une résistance à tous les macrolides, lincosamines et streptogramines B (phénotype MLS_B). Lors d'une étude menée au début des années 2000, portant sur l'efficacité de cette molécule sur différentes bactéries à Gram positif, 4 échecs thérapeutiques ont été décrits dont 3 impliquant des souches de *E. faecium* (Dowzicky *et al.* 2000). Nous avons pu obtenir ces 3 paires de souches (isolées chacune avant et après traitement *in vivo*). Nous avons également obtenu 6 mutants résistants obtenus *in vitro* après passages successifs sur des concentrations croissantes de lincomycine (2 mutants *in vitro*), dalfopristine (2 mutants *in vitro*) et tiamuline (2 mutants *in vitro*). Tous

ces mutants *in vivo* et *in vitro* possèdent une résistance de type LS_AP, phénotype retrouvé naturellement chez *E. faecalis*, mais jamais décrit jusqu'alors chez *E. faecium*.

Objectifs

A partir des souches obtenues avant traitement et des mutants résistants obtenus *in vivo* et *in vitro*, nous avons voulu décrypter le mécanisme moléculaire conférant le phénotype de résistance LS_AP chez *E. faecium*. La cible moléculaire identifiée a été confirmée par remplacement allélique. Enfin, une évaluation de la prévalence de cette résistance a été recherchée sur une collection de souches parfaitement caractérisées de *E. faecium* résistants à la vancomycine, issue de notre laboratoire.

Résultats

Les ADN génomiques de deux souches, une présentant un phénotype sensible aux MLSP (HM1070) et un mutant résistant isogénique (UCN90B) de phénotype LS_AP, ont été extraits puis séquencés grâce à la technologie du 454 Life Sciences (Roche) GS-FLX system. L'analyse génomique comparative nous a permis de mettre en évidence 50 mutations différentes dont une d'intérêt située au sein d'un gène de 1503 pb codant pour une protéine ABC de 500 AA, homologue des autres protéines ABC dites « Lsa-like » connues comme Lsa(A), Lsa(B) ou encore Msr(A). Cette mutation correspondait à une transition C1349T, entraînant la substitution d'une Thréonine, AA polaire hydrophile, par une Isoleucine, AA apolaire, aliphatique et hydrophobe, en position 450 (Figure 26). Il est important de noter ici, que le même AA est retrouvé chez les autres protéines « Lsa-like » conduisant à l'apparition d'un phénotype LS_AP. En utilisant des amorces spécifiques du gène incriminé et de son environnement direct, nous avons mis en évidence que cette mutation (C1349T) était retrouvée chez toutes les souches résistantes obtenues *in vitro* et *in vivo*, alors qu'elle était absente chez toutes les souches présentant un phénotype sensible.

Afin de démontrer le rôle de cette mutation C1349T au sein du gène qui a été dénommé *eat(A)* (pour *Enterococcus ABC Transporter*), nous avons décidé de mener des expériences de mutation allélique par mutagénèse dirigée. Afin de réaliser cette expérience, nous avons amplifié par PCR l'extrémité 3' des gènes *eat(A)* et de son variant *eat(A)_v* contenant la mutation C1349T. L'expérience consistait à introduire l'extrémité du gène muté *eat(A)_v* au sein du génome d'une souche sensible non mutée par remplacement allélique et d'observer une modification du phénotype de résistance. Nous avons procédé de la même façon en introduisant l'extrémité 3' du gène *eat(A)* non muté chez une souche résistante. Le remplacement de l'extrémité 3' du gène *eat(A)* par son variant *eat(A)_v* faisait apparaître un phénotype de résistance LS_{AP} chez une souche initialement sensible. La réciproque a également été observée, nous permettant de démontrer de façon fiable que cette mutation au sein d'une protéine ABC jouait un rôle essentiel dans l'apparition d'un phénotype de résistance de type LSAP chez *E. faecium* (Tableau 4).

Tableau 4. Concentrations Minimales inhibitrices des différentes souches utilisées dans l'étude. ERY, Erythromycine ; LIN, Lincomycine ; CLI, Clindamycine ; DAL, Dalfopristine ; QUI, Quinupristine ; Q-D, Quinupristine-Dalfopristine ; TIA, Tiamuline. UCN94, souche initialement sensible dans laquelle l'allèle muté *eat(A)_v* a été introduit ; UCN95, souche initialement résistante dans laquelle l'allèle sauvage *eat(A)* a été introduit.

Strain	MIC (µg/ml) ^a						
	ERY	LIN	CLI	DAL	QUI	Q-D	TIA
HM1070	0.12	0.25	0.12	4	2	0.5	0.5
<i>In vitro</i> mutants							
UCN90A	0.12	8	2	>64	2	2	32
UCN90B	0.12	8	2	>64	2	2	32
UCN91A	0.12	8	2	>64	2	2	32
UCN91B	0.12	8	2	>64	2	2	32
UCN92A	0.12	8	2	>64	2	2	32
UCN92B	0.12	8	2	>64	2	2	32
UCN94	0.12	8	2	>64	2	2	64
UCN95	0.12	0.25	0.06	4	2	0.5	0.5
<i>Clinical isolates (including in vivo mutants)</i>							
UCN80	>64	>64	>64	2	>64	1	0.5
UCN80-1	>64	>64	>64	16	>64	4	32
UCN81	>64	>64	>64	2	>64	1	0.5
UCN81-1	>64	>64	>64	16	>64	4	32
UCN82	>64	>64	>64	2	>64	0.5	1
UCN82-1	>64	>64	>64	32	>64	4	64

Nous avons par la suite caractérisé l'environnement du gène *eat(A)* et montré la présence d'un site d'initiation transcriptionnelle en amont du gène (221 pb), révélant la présence d'une longue séquence non transcrite en 5' (5' UTR). Enfin, afin de connaître la prévalence de cette mutation chez des souches multi-résistantes de *E. faecium*, nous avons recherché cette dernière parmi 60 souches uniques d'ERV issues du CNR résistance aux antibiotiques. De façon intéressante, nous avons retrouvé une prévalence d'environ 23% chez ces souches hospitalières.

Conclusion

En conclusion, nous avons caractérisé pour la première fois le mécanisme moléculaire de la résistance de type LSAP chez *E. faecium*. Cependant, comme toutes les protéines ABC

de classe II, le mécanisme biochimique de cette résistance reste à élucider. La caractérisation biochimique de cette résistance a été entreprise par une étude transcriptomique de la souche sauvage HM1070, d'un mutant *in vitro* et du mutant KO isogénique.

Ce travail a fait l'objet d'une communication affichée (JRC 2013, annexe 1) et d'une publication internationale dans la revue *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2013).

Publication 1

**Genetic Basis for *In Vitro* and *In Vivo* Resistance to Lincosamides,
Streptogramins A and Pleuromutilins (LSAP phenotype) in *Enterococcus*
*faecium***

Christophe Isnard, Brigitte Malbruny, Roland Leclercq et Vincent Cattoir

Antimicrob. Agents Chemother. AAC.01030-13

Genetic Basis for *In Vitro* and *In Vivo* Resistance to Lincosamides, Streptogramins A, and Pleuromutilins (LS_AP Phenotype) in *Enterococcus faecium*

Christophe Isnard,^a Brigitte Malbruny,^{a†} Roland Leclercq,^{a,b} Vincent Cattoir^{a,b}

CHU de Caen, Service de Microbiologie, Caen, France^a; Université de Caen Basse-Normandie, EA4655 (Équipe Antibiorésistance), Faculté de Médecine, Caen, France^b

As opposed to *Enterococcus faecalis*, which is intrinsically resistant to lincosamides, streptogramins A, and pleuromutilins (LS_AP phenotype) by production of the ABC protein Lsa(A), *Enterococcus faecium* is naturally susceptible. Since this phenotype may be selected for *in vivo* by quinupristin-dalfopristin (Q-D), the aim of this study was to investigate the molecular mechanism of acquired LS_AP resistance in *E. faecium*. Six LS_AP-resistant *in vitro* mutants of *E. faecium* HM1070 as well as three different pairs of clinical isolates (pre- and postexposure to Q-D) were studied. The full genome sequence of an *in vitro* mutant (*E. faecium* UCN90B) was determined by using 454 sequencing technology and was compared with that of the parental strain. Single-nucleotide replacement was carried out to confirm the role of this mutation. By comparative genomic analysis, a point mutation was found within a 1,503-bp gene coding for an ABC homologue showing 66% amino acid identity with Lsa(A). This mutation (C1349T) led to an amino acid substitution (Thr450Ile). An identical mutation was identified in all *in vitro* and *in vivo* resistant strains but was not present in susceptible strains. The wild-type allele was named *eat(A)* (for *Enterococcus* ABC transporter), and its mutated allelic variant was named *eat(A)_v*. The introduction of *eat(A)_v* from UCN90B into HM1070 conferred the LS_AP phenotype, whereas that of *eat(A)* from HM1070 into UCN90B restored susceptibility entirely. This is the first description of the molecular mechanism of acquired LS_AP resistance in *E. faecium*. Characterization of the biochemical mechanism of resistance and the physiological role of this ABC protein need further investigations.

Enterococci, particularly *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, are responsible for numerous infections worldwide, being the second or third most common pathogens in hospitals (1). For several years, these opportunistic pathogens have become more and more resistant to antibiotics with the emergence of vancomycin-resistant *E. faecium* (VREF) isolates belonging mostly to clonal complex 17 (CC17) (2). Since VREF isolates are resistant to β-lactam and glycopeptide antibiotics, only a few molecules are still active against these isolates, such as quinupristin-dalfopristin (Q-D), linezolid, and daptomycin (2, 3).

Q-D is an injectable streptogramin approved by the U.S. FDA for the treatment of severe VREF infections associated with bacteremia (3). Streptogramins form with macrolides (e.g., erythromycin) and lincosamides (e.g., lincomycin and clindamycin), a group of structurally distinct antibiotics (referred to as MLS) that present similar mechanism of action and cross-resistance patterns (4). Actually, streptogramins correspond to a mixture of two compounds that act synergically: streptogramins A (e.g., dalfopristin) and streptogramins B (e.g., quinupristin). In addition, pleuromutilins (e.g., tiamulin) are also a class of protein synthesis inhibitors that share ribosomal binding sites with lincosamide and streptogramin A antibiotics (5).

In enterococci, MLS resistance is due mainly to a ribosomal alteration mediated by a ribosomal methylase encoded by the *erm(B)* or *erm(A)* [formerly designated *erm(TR)*] gene, which is responsible for cross-resistance to all macrolides, lincosamides, and streptogramins B (MLS_B phenotype) that can be constitutive or inducible (4). Besides this common mechanism of resistance, there is a peculiar phenotype exhibiting cross-resistance to lincosamides, streptogramins A, and pleuromutilins, called the LS_AP phenotype (formerly the LS_A phenotype) due to ABC proteins. For instance, intrinsic LS_AP resistance in *E. faecalis* is due to the

production of the ABC (ATP-binding cassette) homologue Lsa(A) (6–8). Other Lsa-like proteins have been involved in LS_AP resistance: Lsa(B) and Lsa(E), identified in *Staphylococcus* spp. (9–12), and Lsa(C), described in *Streptococcus agalactiae* (13, 14). As opposed to *E. faecalis*, *E. faecium* is intrinsically susceptible to all macrolides and related compounds, but this LS_AP phenotype may be selected *in vivo* after Q-D therapy exposure (15). Even if the support of resistance is very likely mediated through a chromosomal mutation(s), the biochemical and genetic basis of this resistance was not elucidated.

The aim of the study was then to (i) identify the molecular mechanism of LS_AP resistance in *E. faecium* mutants selected both *in vitro* and *in vivo*, (ii) confirm the role of a single point mutation in LS_AP resistance by allelic replacement, and (iii) evaluate the prevalence of this resistance mechanism among a collection of well-characterized VREF clinical isolates.

(A preliminary report of this work was presented at the 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, London, United Kingdom, 31 March to 3 April 2012 [16].)

Received 13 May 2013 Returned for modification 10 June 2013
Accepted 29 June 2013

Published ahead of print 8 July 2013

Address correspondence to Vincent Cattoir, cattoir-v@chu-caen.fr.

† Deceased.

This paper is dedicated to the memory of Brigitte Malbruny.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.01030-13

TABLE 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s) and antibiotic resistance(s) ^a	Reference or source
Strains		
<i>E. faecium</i> HM1070	Wild-type parental strain; Fus ^r Rif ^r	31
<i>E. faecium</i> UCN90A	LS _A P ^r mutant derived from HM1070 (selected <i>in vitro</i> with Lin)	This study
<i>E. faecium</i> UCN90B	LS _A P ^r mutant derived from HM1070 (selected <i>in vitro</i> with Lin)	This study
<i>E. faecium</i> UCN91A	LS _A P ^r mutant derived from HM1070 (selected <i>in vitro</i> with Da)	This study
<i>E. faecium</i> UCN91B	LS _A P ^r mutant derived from HM1070 (selected <i>in vitro</i> with Da)	This study
<i>E. faecium</i> UCN92A	LS _A P ^r mutant derived from HM1070 (selected <i>in vitro</i> with Tia)	This study
<i>E. faecium</i> UCN92B	LS _A P ^r mutant derived from HM1070 (selected <i>in vitro</i> with Tia)	This study
<i>E. faecium</i> UCN94	HM1070 derivative with allelic replacement of <i>eat(A)</i> by <i>eat(A)</i> _v from UCN90B (LS _A P phenotype)	This study
<i>E. faecium</i> UCN95	UCN90B derivative with allelic replacement of <i>eat(A)</i> _v by <i>eat(A)</i> from HM1070 (wild-type phenotype)	This study
<i>E. faecium</i> UCN80	Susceptible strain (isolated from patient B)	15
<i>E. faecium</i> UCN80-1	LS _A P ^r mutant derived from UCN80 (selected <i>in vivo</i> with Q-D)	15
<i>E. faecium</i> UCN81	Susceptible strain (isolated from patient C)	15
<i>E. faecium</i> UCN81-1	LS _A P ^r mutant derived from UCN81 (selected <i>in vivo</i> with Q-D)	15
<i>E. faecium</i> UCN82	Susceptible strain (isolated from patient F)	15
<i>E. faecium</i> UCN82-1	LS _A P ^r mutant derived from UCN82 (selected <i>in vivo</i> with Q-D)	15
<i>E. coli</i> TOP10	Cloning strain	Invitrogen
Plasmids		
pCR2.1-TOPO	General AT cloning vector; Kan ^r Amp ^r	Invitrogen
pG1KT	Derivative of the thermosensitive shuttle plasmid pG(+) _{host5} (containing promoterless and terminatorless Kan ^r cassette AphA-3); used for mutagenesis; Ery ^r	19
pG1KTΩ <i>eat(A)</i>	pG1KT derivative carrying the 3' end of <i>eat(A)</i> ; used for allelic replacement in UCN90B	This study
pG1KTΩ <i>eat(A)</i> v	pG1KT derivative carrying the 3' end of <i>eat(A)</i> _v ; used for allelic replacement in HM1070	This study

^a Amp^r, ampicillin resistance; Da, dalfopristin; Ery^r, erythromycin resistance; Fus^r, fusidic acid resistance; Kan^r, kanamycin resistance; Lin, lincomycin; LS_AP, lincosamides-streptogramins A-peuromutilins (LS_AP phenotype); Q-D, quinupristin-dalfopristin; Rif^r, rifampin resistance; Tia, tiamulin; *eat(A)*, wild-type allele; *eat(A)*_v, allele of *eat(A)* with a single mutation (C1349T) leading to an amino acid substitution (Thr450Ile).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and antimicrobial susceptibility testing. Strains selected both *in vitro* and *in vivo* were studied (Table 1). Six LS_AP-resistant mutants of *E. faecium* HM1070 were selected *in vitro* with a frequency of ca. 10⁻⁹ by using lincomycin, dalfopristin, or tiamulin (at 1 μg/ml, 16 μg/ml, and 2 μg/ml, respectively). Approximately 10⁹ CFU of exponentially growing bacteria was plated onto brain heart infusion (BHI) agar containing antibiotic concentrations (i.e., 4× MIC), and mutants were recovered after 48 h of incubation in ambient air at 37°C. Also, three pairs of clinical isolates collected from three different patients who were treated with Q-D were included (15). For each patient, one LS_AP-susceptible isolate (preexposure to Q-D) and one LS_AP-resistant isolate (postexposure to Q-D) were obtained. Noteworthy, strains from each pair were indistinguishable by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (15).

A collection of 60 clonally unrelated (different PFGE profiles) VREF clinical isolates were also screened for the presence of the putative point mutation responsible for LS_AP resistance. These strains were received at the French Reference Centre for Enterococci between 2006 and 2008 and were extensively characterized by phenotypic and genotypic methods (17).

E. faecium HM1070 and *E. faecium* UCN90B were used for allelic replacement experiments. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* TOP10 were used as a control for antimicrobial susceptibility testing and as a cloning strain, respectively.

MICs of erythromycin, lincomycin, clindamycin, dalfopristin, quinupristin, Q-D, and tiamulin were determined by the broth microdilution method (tested range, 0.06 to 64 μg/ml) according to CLSI guidelines (18).

Whole-genome sequencing. Genomic DNA was extracted from mid-log-phase cultures of *E. faecium* HM1070 (LS_AP-susceptible strain) and *E. faecium* UCN90B (LS_AP-resistant mutant derived from *E. faecium* HM1070) by using NucleoBond buffer set III and the NucleoBond AX-G 100 system (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to the manufac-

turer's instructions. High-throughput sequencing was performed by using a 454 Life Sciences (Roche) GS-FLX system (DNAScience, Charleroi, Belgium). Shotgun sequencing for *E. faecium* HM1070 led to an assembly of 138 contigs with sizes ranging from 619 to 83,932 bp, with an aggregate genome size of 2,591,399 bp and an 11.3× average coverage of the genome, while data for *E. faecium* UCN90B were as follows: 268 contigs (sizes from 557 to 91,723 bp), an aggregate genome of 2,562,062 bp, and an 8.5× average genomic coverage. Comparative genomic analysis of the two strains was performed by using the Mosaik (<http://code.google.com/p/mosaik-aligner/>) and Samtools (<http://samtools.sourceforge.net/>) bioinformatics software tools (DNAScience, Charleroi, Belgium). The nucleotide and deduced protein sequences for each contig were analyzed with the BLASTN and BLASTX programs available on the Internet at the National Center for Biotechnology Information website (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

PCR amplification and sequencing. Bacterial genomic DNA was extracted by using the QIAamp DNA minikit (Qiagen, Courtabouef, France). PCR experiments for the detection of the point mutation putatively involved in LS_AP resistance were carried out under standard conditions by using primers synthesized by Sigma-Aldrich France (Table 2). Briefly, 5 μl of total DNA was subjected to PCR in a 50-μl reaction mixture containing 1× PCR buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 200 μM each deoxynucleotide triphosphate, 0.4 μM each primer, and 1 U of GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). PCR amplifications were performed by using a Mastercycler gradient thermal cycler (Eppendorf, Le Pecq, France) as follows: (i) an initial denaturation step for 5 min at 95°C; (ii) 30 cycles of PCR, with 1 cycle consisting of 30 s at 95°C, 30 s at 55°C, and 1 min at 72°C; and (iii) a final extension step for 5 min at 72°C. Purified PCR products were then directly sequenced with the same sets of primers in both directions (GATC Biotech, Konstanz, Germany).

Allelic replacement by site-directed mutagenesis. Fragments containing the 3' ends of the *eat(A)* gene and a variant of the *eat(A)* gene

TABLE 2 Deoxynucleotide primers used in this study

Primer ^a	Nucleotide sequence (5'–3')	Positions ^b	Purpose
lsaF-Efm-F	TTTGAACAACCTCCGAAAGC	660490–660509	Detection of the point mutation in <i>eat(A)</i>
lsaF-Efm-R	TTTCTGTGCCTGCATCTGTC	660927–660946	
lsaF-Efm-mut-F	GCAATCGTGAATCGGATGG	660098–660116	Allelic replacement of <i>eat(A)</i> and checking of pG1KT derivatives
lsaF-Efm-mut-R	GGAATCGTACAGCGAACGC	661148–661166	
M13-Fm	GTTGTAACGACGGCCAG	NA	
M13-Rm	GGATAACAATTCACACAGG	NA	
kana-R	GCTTATACCTTAGCAGGAG	NA	
lsaF-Efm-3'-R	TCCCCTTAACCATACTTGTGG	660791–660812	
lsaF-Efm-cont-F	TCGAGCAGATGAGTATGGG	660543–660561	
lsaF-Efm-cont-R	TTCTAATGTTCTTGATTGAAG	660649–660670	
lsaF-Efm-GSP-R1	TTGCATCAATTGGAGCT	659565–659581	Determination of start transcription site of <i>eat(A)</i> by 5' RACE
lsaF-Efm-GSP-R2	AGGCAAATCTTGCTGATGG	659455–659474	
lsaF-Efm-GSP-R3	TTGTCTTCCCTCGACCGTTT	659386–659405	

^a cont, control; Efm, *Enterococcus faecium*; F, forward primer; GSP, gene-specific primer; mut, mutagenesis; R, reverse primer.

^b Primer positions were determined according to the genome sequence of *E. faecium* Aus0004 (GenBank accession no. NC_017022). NA, not applicable.

[*eat(A)*]_v were amplified by using primers lsaF-Efm-mut-F and lsaF-Efm-mut-R (Table 2) from *E. faecium* HM1070 and *E. faecium* UCN90B, respectively. PCR products were cloned into the pCR2.1-TOPO plasmid (Invitrogen) and transformed into *E. coli* TOP10 cells. Recombinant plasmids were extracted by using a QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Courtabouef, France), according to the manufacturer's instructions, and then digested with the EcoRI enzyme (New England BioLabs, Evry, France). Restriction products were then cloned into the thermosensitive plasmid pG1KT, which is a derivative of the shuttle plasmid pG(+)-host5 containing the promoterless and terminatorless kanamycin resistance cassette AphA-3 (19), as previously described (20). Briefly, *E. coli* transformants were selected on medium containing erythromycin (150 µg/ml), and construction was checked by specific PCR amplifications (Table 2). Recombinant plasmids pG1KT Ω *eat(A)* and pG1KT Ω *eat(A)*_v were then introduced by electrotransformation into *E. faecium* UCN90B and *E. faecium* HM1070, respectively (Table 1). *E. faecium* transformants were selected on medium containing kanamycin (500 µg/ml) and erythromycin (15 µg/ml) after an incubation step at 42°C, allowing plasmid integration into the chromosome. The spontaneous loss of pG1KT was obtained by daily subculture in tryptone-soy broth (AES Laboratories, Combourg, France) at 30°C with no antibiotic. Candidate colonies were tested for their susceptibility to MLS and checked by PCR sequencing.

5' RACE. Total RNAs were extracted from cultures of *E. faecium* HM1070 by using the ZR Fungal/Bacterial RNA Miniprep kit (Zymo Research, Irvine, CA). The transcription start site (TSS) and promoter sequences were then determined by using the 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE) system kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions, with different specific primers (Table 2).

Multiple alignment and phylogenetic analysis. Sequence comparison and phylogenetic analysis were performed by using the neighbor-joining algorithm with ClustalX software (version 1.83).

Nucleotide sequence accession numbers. The nucleotide sequences of *eat(A)* and *eat(A)*_v were deposited in the GenBank database under accession no. KF010778 and KF010779, respectively.

RESULTS

Identification of a single mutation in an *Lsa*-like gene. By comparing the entire genome of *E. faecium* HM1070 (LS_AP-susceptible strain) and that of *E. faecium* UCN90B (LS_AP-resistant mutant derived from *E. faecium* HM1070), we found 50 different mutations, including one within a 1,503-bp gene coding for a 500-amino-acid (ca. 58-kDa) ABC protein homologue of *Lsa*-like proteins. This mutation was responsible for a transition (C1349T)

leading to the amino acid substitution Thr450Ile (Fig. 1). By using specific PCR primers, a strictly identical mutation (C1349T) was identified among all *in vitro* and *in vivo* resistant strains but was not present in susceptible strains. According to the recommendations for tetracycline and MLS nomenclature (<http://faculty.washington.edu/marilynr/>), the wild-type gene was named *eat(A)* (for *Enterococcus* ABC transporter), whereas the allele with the single point mutation C1349T was designated *eat(A)*_v. A BLAST analysis showed that *eat(A)* was present in all sequenced *E. faecium* genomes but not in other enterococcal species (data not shown), suggesting that *eat(A)* is species specific for *E. faecium* and is an intrinsic gene of this species. The Eat(A) protein displayed 66%, 44%, 43%, and 42% amino acid identities with other proteins conferring LS_AP-type resistance in various Gram-positive organisms, *Lsa(A)*, *Lsa(E)*, *Lsa(B)*, and *Lsa(C)*, respectively. Like other *Lsa*-like proteins, the structure of Eat(A) showed duplications of Walker A and B motifs, the ABC signature, and the H-loop switch (Fig. 1).

Drug susceptibility patterns conferred by the single mutation C1349T. By single-nucleotide allelic replacement, we demonstrated that the unique substitution Thr450Ile was responsible for the LS_AP phenotype (Table 3). Indeed, the introduction of the mutated allele *eat(A)*_v from *E. faecium* UCN90B into susceptible *E. faecium* strain HM1070 (also known as strain UCN94) conferred the LS_AP phenotype with an increase of MICs of lincomycin (from 0.25 to 8 µg/ml), clindamycin (from 0.12 to 2 µg/ml), dal-fopristin (from 4 to >64 µg/ml), Q-D (from 0.5 to 2 µg/ml), and tiamulin (from 0.5 to 64 µg/ml), whereas MICs of erythromycin and quinupristin did not change (Table 3). Conversely, the introduction of the wild-type allele *eat(A)* from *E. faecium* HM1070 into LS_AP-resistant *E. faecium* strain UCN90B (also known as strain UCN95) restored entire susceptibility to lincomycin (from 8 to 0.25 µg/ml), clindamycin (from 2 to 0.06 µg/ml), dal-fopristin (from >64 to 4 µg/ml), Q-D (from 2 to 0.5 µg/ml), and tiamulin (from 32 to 0.5 µg/ml), with no alteration of MICs of erythromycin and quinupristin (Table 3).

In addition, all *in vitro* mutants harboring the C1349T mutation presented the same LS_AP phenotype as strain UCN90B, with MICs of lincomycin, clindamycin, dal-fopristin, Q-D, and tiamu-

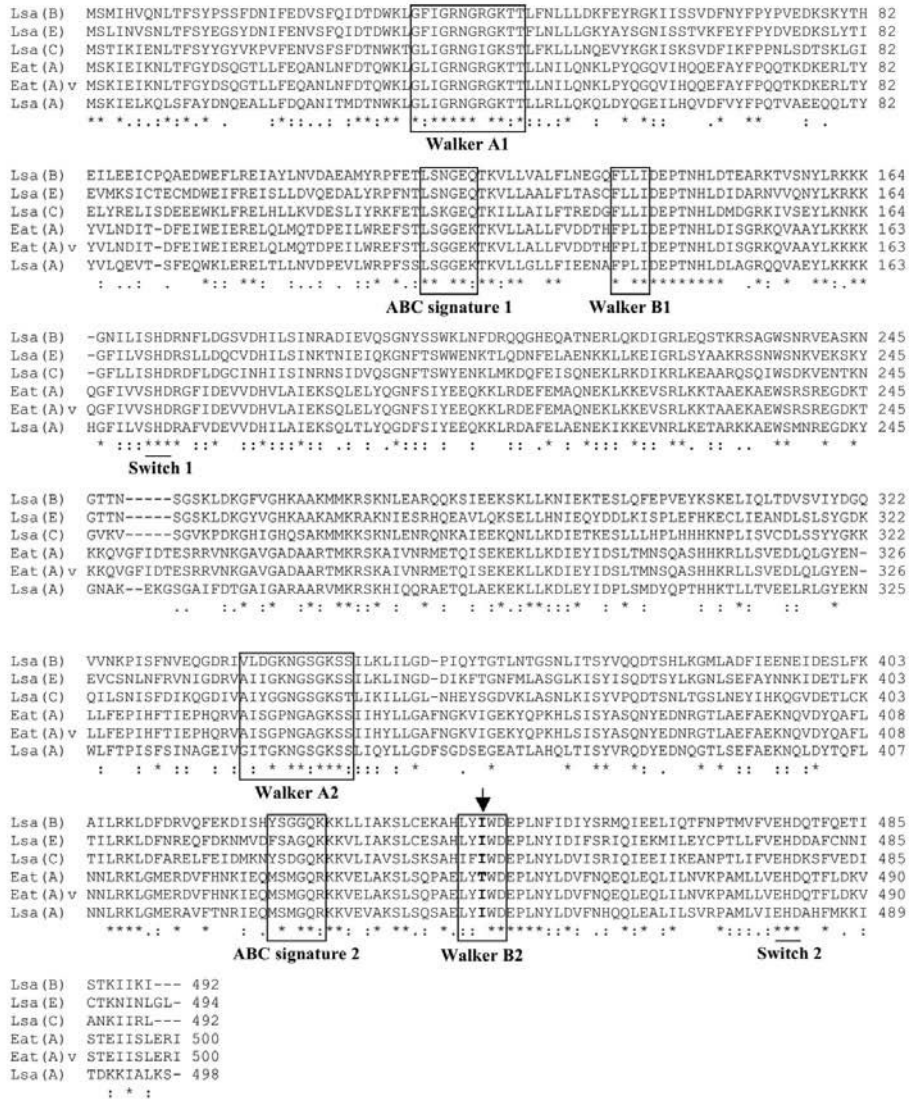


FIG 1 Amino acid sequence comparison of the Eat(A) and Eat(A)_v, ABC proteins with Lsa-like proteins involved in MLS resistance, Lsa(A), Lsa(B), Lsa(C), and Lsa(E). The two copies of Walker A and B motifs and ABC signatures are boxed. Similarities in amino acid sequences are marked by asterisks (same amino acid), colons (strong similarity), and dots (family similarity). Multiple-sequence alignment was done with ClustalX 1.83 software. The location of the Thr450Ile substitution is indicated by an arrow.

lin at 8, 2, >64, 2, and 32 µg/ml, respectively (Table 3). Concerning clinical isolates, all were highly resistant to erythromycin, lincomycin, clindamycin, and quinupristin due to a MLS_B phenotype mediated by the *erm(B)* gene (data not shown), but only *in vivo* mutants with the C1349T mutation presented the LS_AP phenotype (Table 3).

Genetic environment of *eat(A)* in *E. faecium* Aus0004. In the genome of *E. faecium* Aus0004, the *eat(A)* gene corresponded to the gene *EFAU004_00630* (positions 659270 to 660772). This gene was surrounded by the two genes *EFAU004_00629* (positions 657891 to 659012) and *EFAU004_00631* (positions 659270 to 660772), coding for a glycerate kinase (373 amino acids) and a

TABLE 3 MICs of macrolides and related compounds for *E. faecium* strains

Strain	MIC (µg/ml) ^a						
	ERY	LIN	CLI	DAL	QUI	Q-D	TIA
HM1070	0.12	0.25	0.12	4	2	0.5	0.5
<i>In vitro</i> mutants							
UCN90A	0.12	8	2	>64	2	2	32
UCN90B	0.12	8	2	>64	2	2	32
UCN91A	0.12	8	2	>64	2	2	32
UCN91B	0.12	8	2	>64	2	2	32
UCN92A	0.12	8	2	>64	2	2	32
UCN92B	0.12	8	2	>64	2	2	32
UCN94	0.12	8	2	>64	2	2	64
UCN95	0.12	0.25	0.06	4	2	0.5	0.5
Clinical isolates (including <i>in vivo</i> mutants)							
UCN80	>64	>64	>64	2	>64	1	0.5
UCN80-1	>64	>64	>64	16	>64	4	32
UCN81	>64	>64	>64	2	>64	1	0.5
UCN81-1	>64	>64	>64	16	>64	4	32
UCN82	>64	>64	>64	2	>64	0.5	1
UCN82-1	>64	>64	>64	32	>64	4	64

^a CLI, clindamycin; DAL, dalbopristin; ERY, erythromycin; LIN, lincomycin; Q-D, quinupristin-dalbopristin; QUI, quinupristin; TIA, tiamulin.

phosphoglycerate mutase (175 amino acids), respectively (Fig. 2). Bioinformatically, no operon structure was predicted, and we unambiguously determined the TSS to be 221 bp upstream of the start codon of *eat(A)*, revealing a long 5' untranslated region (UTR) (Fig. 2).

Prevalence of the mutated allele *eat(A)*, among VREF clinical isolates. Out of the 60 VREF isolates, the point mutation C1349T was detected in 14 (23.3%) strains by PCR sequencing. All the VREF isolates were highly resistant to macrolides, lincosamides, and quinupristin (MLS_B phenotype). On the other hand, all *eat(A)*_v-positive strains were also resistant to quinupristin-dalbopristin and tiamulin, whereas all susceptible strains (except two) remained entirely susceptible to these antibiotics (data not

shown). This suggests that these molecules may be used as phenotypic markers of resistance in the case of combined resistance mechanisms.

DISCUSSION

ABC systems constitute one of the largest families of proteins, with most of them being involved in import and export, often called ABC transporters (21). These transporters share an organization with two hydrophobic transmembrane domains (TMDs) and two intracytoplasmic nucleotide-binding domains (NBDs) implicated in ATP hydrolysis and comprising specific motifs (Walker A and B motifs and the ABC signature) that are conserved in all ABC proteins (22). Besides importers and exporters, there is a third group

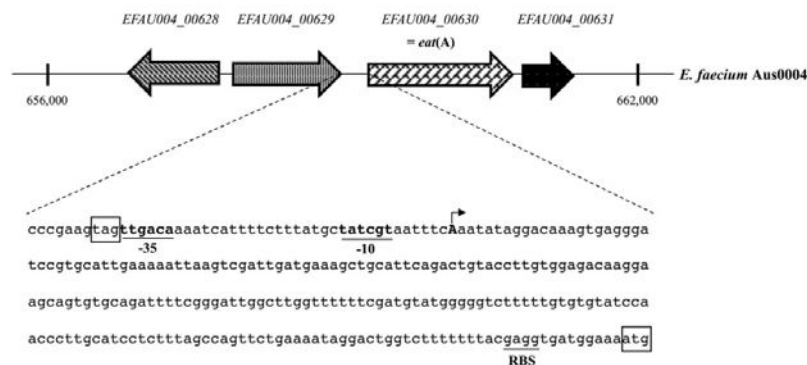


FIG 2 Schematic map of genetic environment of *eat(A)* (i.e., EFAU004_00630) in the genome of *E. faecium* Aus0004 (GenBank accession no. NC_017022). Open reading frames are shown as arrows indicating the orientation of their coding sequence. The genes EFAU004_00628, EFAU004_00629, and EFAU004_00631 code for a 2-dehydropentose 2-reductase, a glycerate kinase, and a phosphoglycerate mutase, respectively. The nucleotide sequence corresponding to the upstream region of the *eat(A)* gene is represented in detail. The -35 and -10 promoter boxes are underlined, and the transcription start site is represented by an arrow. The start codon of *eat(A)* and its putative ribosome-binding site (RBS) as well as the stop codon of EFAU004_00629 are also indicated.

of ABC proteins (named class 2) that lack TMDs, consisting of two NBDs fused into a single protein (21–23). Several of these class 2 ABC systems have been involved in MLS resistance, such as Msr-, Vga-, or Lsa-like proteins (21).

The observed profile of cross-resistance to lincosamides, streptogramins A, and pleuromutilins conferred by Eat(A)_o was similar to those conferred by other Lsa-like proteins. In *Enterococcus faecalis*, Lsa(A) is responsible for intrinsic LS_AP resistance (6, 14). Lsa(B), encoded by a plasmid-borne gene from *Staphylococcus sciuri*, confers an increase in MICs of lincosamides, whereas streptogramins A and pleuromutilins had not been tested; however, a LS_AP phenotype is very likely (9). A chromosomal gene, Lsa(C), was demonstrated to be responsible for acquired LS_AP resistance in *Streptococcus agalactiae* clinical isolates (14). Very recently, a novel gene, named Lsa(E), which likely originated from *E. faecalis*, was found in both methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* isolates of animal and human origins (11, 12). Interestingly, all Lsa-like proteins conferring a LS_AP phenotype [i.e., Lsa(A), Lsa(B), Lsa(C), Lsa(E), and Eat(A)_o] possess an isoleucine (a hydrophobic amino acid) instead of a threonine (a polar neutral amino acid) (Fig. 1). This suggests an important role of position 450 in LS_AP resistance, since it is located within the Walker B motif of the second NBD, a domain known to be involved in ATP binding (24).

Another important question that remains poorly elucidated is the biochemical mechanism of resistance. Indeed, even if class 2 ABC proteins are presumed to act as efflux pump systems, only one study of Msr(A) suggests that these proteins might be able to hijack the TMDs of ABC transporters to mediate efflux (25). However, no membrane partners for Msr(A) have clearly been identified so far (26). A ribosomal protection mechanism of resistance might also be hypothesized. Since eat(A) is an innate gene in *E. faecium*, it is obvious that it has a physiological role in the bacterial cell, and Eat(A) might be involved in protein translation since Lsa-like proteins are homologous to the eukaryotic elongation factor eEF-3 from the fungus *Saccharomyces cerevisiae* (27).

Concerning the expression of the eat(A) gene, a long 5' UTR has been identified, suggesting either a transcriptional mechanism or a posttranscriptional (translational) regulation mechanism. Transcriptional attenuation may occur since a Rho-independent transcription terminator has been bioinformatically predicted (data not shown). This regulatory strategy is largely used by bacteria for sensing intracellular signals (28) and has already been described for the regulation of erm(K), another MLS resistance determinant (29). Also, a 44-amino-acid putative peptide preceding the eat(A) start codon was identified, which may be part of a mechanism of translational attenuation; however, no obvious inverted repeat sequences have been found (data not shown). The presence of a leader peptide in the 5' UTR has been reported or postulated to be involved in the posttranscriptional regulation of several MLS resistance genes, such as erm(A), erm(B), erm(C), msr(A), Lsa(A), and Lsa(B) (6, 9, 30). Further investigations are currently in progress to determine the exact mechanism of eat(A) expression regulation.

In conclusion, this is the first characterization of the molecular mechanism of the acquired LS_AP resistance phenotype in *E. faecium*. Even though the LS_AP phenotype could be phenotypically detected, PCR detection using specific primers may be needed, especially for *E. faecium* strains with combined resistance mechanisms (e.g., the MLS_B phenotype). As for other ABC proteins of

this class, the biochemical mechanism of resistance and the physiological role will need to be further investigated.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by a grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (EA4655), Université Caen Basse-Normandie, France.

We gratefully acknowledge the technical assistance of Michel Auzou. We kindly thank Marilyn C. Roberts for providing us the gene name according to the nomenclature center for MLS genes (<http://faculty.washington.edu/marilynr/>).

REFERENCES

- Arias CA, Murray BE. 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 10:266–278.
- Cattoir V, Leclercq R. 2013. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *J. Antimicrob. Chemother.* 68:731–742.
- Eliopoulos GM. 2003. Quinupristin-dalfopristin and linezolid: evidence and opinion. *Clin. Infect. Dis.* 36:473–481.
- Leclercq R. 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin. Infect. Dis.* 34:482–492.
- Novak R, Shlaes DM. 2010. The pleuromutilin antibiotics: a new class for human use. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 11:182–191.
- Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. 2002. An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1845–1850.
- Dina J, Malbrun B, Leclercq R. 2003. Nonsense mutations in the Lsa-like gene in *Enterococcus faecalis* isolates susceptible to lincosamides and streptogramins A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2307–2309.
- Singh KV, Murray BE. 2005. Differences in the *Enterococcus faecalis* Lsa locus that influence susceptibility to quinupristin-dalfopristin and clindamycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:32–39.
- Kehrenberg C, Ojo KK, Schwarz S. 2004. Nucleotide sequence and organization of the multiresistance plasmid pSCFS1 from *Staphylococcus sciuri*. *J. Antimicrob. Chemother.* 54:936–939.
- Kehrenberg C, Aarestrup FM, Schwarz S. 2007. IS21-558 insertion sequences are involved in the mobility of the multiresistance gene *cf.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:483–487.
- Wendlandt S, Lozano C, Kadlec K, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C, Schwarz S. 2013. The enterococcal ABC transporter gene Lsa(E) confers combined resistance to lincosamides, pleuromutilins and streptogramin A antibiotics in methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 68:473–475.
- Li B, Wendlandt S, Yao J, Liu Y, Zhang Q, Shi Z, Wei J, Shao D, Schwarz S, Wang S, Ma Z. 2013. Detection and new genetic environment of the pleuromutilin-lincosamide-streptogramin A resistance gene Lsa(E) in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of swine origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 68:1251–1255.
- Malbrun B, Werno AM, Anderson TP, Murdoch DR, Leclercq R. 2004. A new phenotype of resistance to lincosamide and streptogramin A-type antibiotics in *Streptococcus agalactiae* in New Zealand. *J. Antimicrob. Chemother.* 54:1040–1044.
- Malbrun B, Werno AM, Murdoch DR, Leclercq R, Cattoir V. 2011. Cross-resistance to lincosamides, streptogramins A, and pleuromutilins due to the Lsa(C) gene in *Streptococcus agalactiae* UCN70. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:1470–1474.
- Dowzicky M, Talbot GH, Feger C, Prokocimer P, Etienne J, Leclercq R. 2000. Characterization of isolates associated with emerging resistance to quinupristin/dalfopristin (Synercid) during a worldwide clinical program. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 37:57–62.
- Malbrun B, Leclercq R, Cattoir V. 2012. Abstr 22nd Eur. Congr. Clin. Microbiol. Infect. Dis., London, United Kingdom, 31 March to 3 April 2012, abstr P1284.
- Bérenger R, Bourdon N, Auzou M, Leclercq R, Cattoir V. 2011. In vitro activity of new antimicrobial agents against glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* clinical isolates from France between 2006 and 2008. *Med. Mal. Infect.* 41:405–409.

18. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; approved standard, 23rd ed., M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
19. Lalioui L, Pellegrini E, Dramsi S, Baptista M, Bourgeois N, Doucet-Populaire F, Rusniok C, Zouine M, Glaser P, Kunst F, Poyart C, Trieu-Cuot P. 2005. The SrtA sortase of *Streptococcus agalactiae* is required for cell wall anchoring of proteins containing the LPXTG motif, for adhesion to epithelial cells, and for colonization of the mouse intestine. *Infect. Immun.* 73:3342–3350.
20. Arsène S, Leclercq R. 2007. Role of a *qnr*-like gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3254–3258.
21. Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J. 2008. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72:317–364.
22. Biemans-Oldehinkel E, Doeven MK, Poolman B. 2006. ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett.* 580:1023–1035.
23. Kos V, Ford RC. 2009. The ATP-binding cassette family: a structural perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* 66:3111–3126.
24. Falcón-Pérez JM, Martínez-Burgos M, Molano J, Mazón MJ, Eraso P. 2001. Domain interactions in the yeast ATP binding cassette transporter Yef1p: intragenic suppressor analysis of mutations in the nucleotide binding domains. *J. Bacteriol.* 183:4761–4770.
25. Ross JI, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ, Baumberg S, Wootton JC. 1990. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol. Microbiol.* 4:1207–1214.
26. Reynolds E, Ross JI, Cove JH. 2003. Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: incomplete transporters? *Int. J. Antimicrob. Agents* 22:228–236.
27. Andersen CB, Becker T, Blau M, Anand M, Halic M, Balar B, Mielke T, Boesen T, Pedersen JS, Spahn CM, Kinzy TG, Andersen GR, Beckmann R. 2006. Structure of eEF3 and the mechanism of transfer RNA release from the E-site. *Nature* 443:663–668.
28. Merino E, Yanofsky C. 2005. Transcription attenuation: a highly conserved regulatory strategy used by bacteria. *Trends Genet.* 21:260–265.
29. Kwak JH, Choi EC, Weisblum B. 1991. Transcriptional attenuation control of *ermK*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinant from *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 173:4725–4735.
30. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P. 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:79–114.
31. Bozdogan B, Leclercq R. 1999. Effects of genes encoding resistance to streptogramins A and B on the activity of quinupristin-dalfopristin against *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2720–2725.

1.2. Publication 2 : Etude génomique de la baisse de sensibilité à la Tigécycline chez *E. faecium*.

Contexte

Face à l'émergence de souches multi-résistantes aux antibiotiques chez *E. faecium*, mais également chez *S. aureus* et certaines entérobactéries, de nouvelles molécules thérapeutiques à large spectre ont vu le jour depuis 30 ans. Parmi elles, la tigécycline (TIG), unique représentant alors de la famille des glycylicyclines. Cette famille d'antibiotiques présente un intérêt certain car elle n'est pas affectée par les mécanismes d'efflux ou de protection ribosomale qui peuvent impacter d'autres familles antibiotiques comme les tétracyclines dites classiques, les fluoroquinolones ou encore les aminosides (Sum *et al.* 1998). De plus, cette molécule présente l'intérêt de ne pas entraîner la formation de mutants résistants dans le modèle *E. coli* (Projan 2000) et d'être extrêmement active sur les souches de *E. faecium* sensibles et résistantes aux glycopeptides. Très peu de cas de souches résistantes ont été rapportées chez les bactéries à Gram positif. Du fait de l'importance stratégique de cet antibiotique dans l'armada thérapeutique utilisable contre les bactéries multi-résistantes comme *E. faecium*, le but de ce travail a été de comprendre le mécanisme d'acquisition d'une résistance chez *E. faecium* en obtenant des souches de sensibilité diminuée *in vitro* mais aussi *in vivo* et de comparer leurs génomes avec une souche sensible afin d'identifier de gènes potentiellement impliqués dans l'apparition de la diminution de sensibilité à la tigécycline.

Résultats

En premier lieu, nous avons obtenu des mutants *in vitro* de sensibilité diminuée à la tigécycline, à partir des souches *E. faecium* Aus0004 (Lam *et al.* 2012) et *E. faecium* HM1070 (Bozdogan et Leclercq 1999). Pour ce faire, des ensemencements sériés sur géloses contenant des concentrations croissantes de TIG ont été effectués. Nous avons ainsi pu obtenir un

mutant à partir de la souche de *E. faecium* Aus0004 (AusTig) et deux mutants à partir de HM1070 (HMtig1 et HMtig2). Ces souches possédaient des CMI de la tigécycline à 0,25, 0,5 et 0,25 mg/L, respectivement. Nous avons ensuite extrait l'ADN génomique du mutant AusTig et séquencé ce dernier par la technique Illumina (ProfilXpert, Lyon). L'analyse génomique comparative réalisée entre le génome de AusTig et la souche parentale Aus0004 nous a permis de mettre en évidence la présence de 4 SNP (Tableau 5)

Tableau 5. SNP retrouvés au sein du génome de AusTig par comparaison avec le génome de la souche parentale Aus0004. Les noms des gènes et les positions nucléotidiques sont issus de la séquence annotée de la souche *E. faecium* Aus0004 (NC_017022) (Lam *et al.* 2012).

Gène	Produit	Mutation (position)	Changement en AA
Efau004_00094	Protéine S10 de la SU 30S	G→T (97.523)	Asp60 → Tyr
Efau004_01228	Transporteur cationique	T→A (1.257.670)	Asn80 → Ile
Efau004_01636	Protéine hypothétique	G→T (1.651.985)	Val54 → Leu
Efau004_02455	L-lactate oxydase	G→A (2.474.071)	Ala100 → Thr

Afin de déterminer quelle mutation était responsable de cette diminution de sensibilité à la tigécycline chez *E. faecium*, nous avons dans un premier temps amplifié les gènes correspondants chez les autres mutants obtenus. De façon intéressante, le gène Efau004_01636 a seulement été retrouvé chez la souche Aus004 et semblerait donc faire partie du génome accessoire de la bactérie. Les gènes Efau004_01228 et Efau004_02455 présentaient chez les autres souches testées, la même séquence nucléotidique que la souche parentale sensible Aus0004. De plus, afin de confirmer l'absence de rôle dans l'apparition de la résistance du gène codant pour un transporteur cationique, nous avons effectué des déterminations de CMI en présence d'inhibiteurs des pompes d'efflux (réserpine et

pantoprazole). En présence de ces inhibiteurs, les CMI de la tigécycline n'étaient pas impactées. Enfin, nous avons décidé de construire un mutant délété isogénique chez lequel la sensibilité à la tigécycline n'était pas modifiée.

Sur les 5 souches résistantes que nous avons utilisées dans cette étude, 4 présentaient une mutation au sein du gène Efau004_00094 (*rpsJ*) codant pour la protéine S10. Les 3 souches obtenues *in vitro* possédaient la même substitution en position 60 (D60Y), alors qu'une des souches cliniques possédait une mutation en position 57 (K57E). La dernière souche clinique ne possédait pas quant à elle de mutation dans le gène *rpsJ*, nous permettant de supposer que l'apparition d'une mutation dans *rpsJ* joue un rôle dans la diminution de sensibilité à la tigécycline mais ne semble pas être la seule explication à cette dernière. Dans des travaux postérieurs au notre, l'équipe de Werner a ainsi démontré que la présence des gènes *tet(M)* et *tet(L)* au sein d'un plasmide à haut nombre de copies était responsable de l'apparition d'une sensibilité diminuée à la tigécycline (Fiedler *et al.* 2016). De façon intéressante, notre souche *in vivo* non mutée en *rpsJ* était porteuse de ces deux gènes, ce qui pourrait expliquer la diminution de sensibilité à la tigécycline chez cette souche.

Conclusion

Nous avons pu mettre en évidence pour la première fois une mutation dans un gène codant pour une protéine impliquée dans l'architecture de la SU 30S du ribosome qui semblerait être importante dans l'apparition d'une diminution de sensibilité à la tigécycline chez *E. faecium*. Cette baisse de sensibilité à la tigécycline médiée par l'apparition d'une mutation au sein du gène *rpsJ* a également été retrouvée chez d'autres espèces tant à Gram positif qu'à Gram négatif.

Ce travail a fait l'objet d'une publication internationale dans la revue *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2015)

Publication 2

**Genomic Analysis of reduced Susceptibility to Tigecycline in *Enterococcus*
*faecium***

Vincent Cattoir, Christophe Isnard, Thibaud Cosquer, Arlène Odhiambo, Fiona Bucquet,
François Guérin et Jean-Christophe Giard

Antimicrob. Agents Chemother. AAC.04174-14

Genomic Analysis of Reduced Susceptibility to Tigecycline in *Enterococcus faecium*

Vincent Cattoir,^{a,b,c} Christophe Isnard,^{a,b} Thibaud Cosquer,^a Arlène Odhiambo,^a Fiona Bucquet,^a François Guérin,^{a,b,c} Jean-Christophe Giard^a

Université de Caen Basse-Normandie, EA4655 U2RM (Équipe Antibio-Résistance), Caen, France^a; CHU de Caen, Service de Microbiologie, Caen, France^b; CNR de la Résistance aux Antibiotiques, Laboratoire Associé Entérocoques, Caen, France^c

Tigecycline (TIG) is approved for use for the treatment of complicated intra-abdominal infections, skin and skin structure infections, as well as pneumonia. Acquired resistance or reduced susceptibility to TIG has been observed in Gram-negative rods, has seldom been reported in Gram-positive organisms, and has not yet been reported in *Enterococcus faecium*. Using the serial passage method, *in vitro* mutant AusTig and *in vitro* mutants HMTig1 and HMTig2 with decreased TIG susceptibility (MICs, 0.25 µg/ml) were obtained from strains *E. faecium* Aus0004 and HM1070 (MICs, 0.03 µg/ml), respectively. In addition, two vancomycin-resistant *E. faecium* clinical isolates (EF16 and EF22) with reduced susceptibility to TIG (MICs, 0.5 and 0.25 µg/ml, respectively) were studied. Compared to the wild-type strains, the *in vitro* mutants also showed an increase in the MICs of other tetracyclines. An efflux mechanism did not seem to be involved in the reduced TIG susceptibility, since the presence of efflux pump inhibitors (reserpine or pantoprazole) did not affect the MICs of TIG. Whole-genome sequencing of AusTig was carried out, and genomic comparison with the Aus0004 genome was performed. Four modifications leading to an amino acid substitution were found. These mutations affected the *rpsJ* gene (*efau004_00094*, coding for the S10 protein of the 30S ribosomal subunit), *efau004_01228* (encoding a cation transporter), *efau004_01636* (coding for a hypothetical protein), and *efau004_02455* (encoding the L-lactate oxidase). The four other strains exhibiting reduced TIG susceptibility were screened for the candidate mutations. This analysis revealed that three of them showed an amino acid substitution in the same region of the RpsJ protein. In this study, we characterized for the first time genetic determinants linked to reduced TIG susceptibility in enterococci.

Enterococcus faecium is a Gram-positive bacterium and is part of the human intestinal microbiota. Beside *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* is among the leading causes of hospital-acquired infections (1). Usually considered a microorganism with a limited clinical relevance, *E. faecium* has become a major opportunistic pathogen responsible for numerous infections, such as bacteremia, endocarditis, and urinary tract and intra-abdominal infections. This increased prevalence mainly results from the worldwide spread of hospital-adapted strains belonging to clonal complex 17 (CC17) (2). Because of its high genome plasticity, *E. faecium* may acquire numerous determinants of antimicrobial resistance, and most CC17 isolates are highly resistant to ampicillin and fluoroquinolones, while a significant proportion of them are resistant to glycopeptides (the so-called vancomycin-resistant enterococci [VRE]) (3). Thus, only a few alternative options (i.e., linezolid, daptomycin, or tigecycline [TIG]) remain available for the treatment of infections caused by these resistant microorganisms. Even if resistance to these compounds is still uncommon, some *E. faecium* clinical isolates with reduced susceptibility or resistance to antibiotics (but not to TIG) have already been reported (3), and a better understanding of the resistance mechanisms is needed for limiting their dissemination.

TIG is the only representative of the glycylcyclines, a new group of tetracyclines (4). This compound is actually the 9-*tert*-butylglycylamido derivative of minocycline (5). It exhibits bacteriostatic activity against a large panel of Gram-positive and Gram-negative bacteria, except *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* (4). Like classical tetracyclines, TIG inhibits bacterial protein synthesis by interacting reversibly with the 30S ribosomal subunit. This prevents the binding of the tRNA acceptor site on the ribosome and thus blocks the elongation step (4). Interest-

ingly, TIG interacts with the ribosomal target with a 5-fold higher affinity, overcoming the main mechanisms of resistance to classical tetracyclines (i.e., ribosomal protection and active efflux) (6). In *Escherichia coli*, decreased susceptibility to TIG is due to MarA-mediated overexpression of the AcrAB-TolC efflux pump system (7). Similarly, TIG resistance in members of the *Enterobacteriaceae* other than *E. coli* and *Acinetobacter baumannii* also results from increased expression of operons encoding resistance-nodulation-cell division (RND) efflux pumps (8, 9). In Gram-positive organisms, previous experiments have shown that *in vitro* TIG resistance in *S. aureus* could be obtained by serial passage in increasing antibiotic concentrations (up to an MIC of 16 µg/ml). This resistance is also correlated with overexpression of an efflux pump gene, *mepA*, coding for a transporter belonging to the multidrug and toxin extrusion (MATE) family (10). In enterococci, clinical isolates with reduced TIG susceptibility (MIC > 0.25 µg/ml) seem to be exceptionally selected *in vivo*, and only a few strains have been reported so far (11, 12). However, the genetic basis of resis-

Received 27 August 2014 Returned for modification 19 September 2014
Accepted 17 October 2014

Accepted manuscript posted online 27 October 2014

Citation Cattoir V, Isnard C, Cosquer T, Odhiambo A, Bucquet F, Guérin F, Giard J-C. 2015. Genomic analysis of reduced susceptibility to tigecycline in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 59:239–244. doi:10.1128/AAC.04174-14.

Address correspondence to Vincent Cattoir, cattoir-v@chu-caen.fr.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/AAC.04174-14

TABLE 1 Bacterial strains and plasmids used in the study

Strain or plasmid	Relevant properties	Reference or source
Strains		
<i>E. faecium</i>		
Aus0004	Reference strain	14
HM1070	Reference strain	15
AusTig	<i>In vitro</i> mutant from Aus0004 with reduced susceptibility to TIG	This study
HMTig1	<i>In vitro</i> mutant from HM1070 with reduced susceptibility to TIG	This study
HMTig2	<i>In vitro</i> mutant from HM1070 with reduced susceptibility to TIG	This study
EF16	Clinical isolate with reduced susceptibility to TIG	This study
EF22	Clinical isolate with reduced susceptibility to TIG	This study
AusΔ1228	Knockout mutant for <i>efau004_1228</i> from Aus0004	This study
<i>E. coli</i> EC1000	<i>E. coli</i> cloning host	16
Plasmids		
pWS3		20
pWS3-rpsJ	Δ <i>rpsJ</i> allele cloned into pWS3	This study
pWS3-1228	Δ <i>efau004_1228</i> allele cloned into pWS3	This study

tance has not yet been evidenced, while no resistant strains (selected *in vitro* or *in vivo*) have been described in *E. faecium*.

The aim of this study was to identify potential genes associated with reduced TIG susceptibility in *E. faecium*. Comparative genome analysis of one mutant obtained *in vitro* and its parental strain allowed detection of a mutation within the *rpsJ* gene, coding for the ribosomal S10 protein. The role of RpsJ changes in reduced TIG susceptibility was confirmed by demonstrating the absence of efflux and by using additional *in vitro* mutants and clinical isolates.

(A preliminary report of this work was presented at the 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC, USA, 2014 [13].)

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates and growth conditions. The bacterial strains used in this study are listed in Table 1. *In vitro* mutants with decreased TIG susceptibility were obtained from strains *E. faecium* Aus0004 (14) and HM1070 (15) after serial passage on Mueller-Hinton (MH) medium containing increased concentrations of TIG (from 0.03 to 0.25 μg/ml). Briefly, three petri dishes of MH medium with 2-fold-increasing concentrations of TIG were inoculated with approximately 5×10^9 CFU of the *E. faecium* strains. After overnight incubation at 37°C, bacterial cells grown in the presence of the highest drug concentration were used to prepare the inoculum for a series of three MH medium plates containing 2-fold-increasing concentrations of TIG. This process was repeated for 25 days (ca. 700 generations), and the MICs of TIG were checked at each round. HMTig1 and HMTig2 were obtained by two experiments performed in parallel and therefore correspond to technical replicates. To test the stability of the reduced susceptibility to TIG, mutants were grown for 15 days (ca. 400 generations) on brain heart infusion (BHI) medium in the absence of any selective pressure.

Two vancomycin-resistant clinical isolates of *E. faecium* (EF16 and EF22) with reduced susceptibility to TIG were obtained from the collection of the National Reference Center for enterococci (CHU, Caen, France). EF16 was obtained in 2010 from a patient hospitalized in the north of France, while EF22 was isolated in 2013 from a patient hospitalized in the French southeast region. Both were isolated from rectal swabs.

E. faecium bacterial cells were routinely incubated in BHI broth at 37°C without agitation, whereas the *E. coli* EC1000 strain (16) was cultured under vigorous shaking (250 rpm) at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium.

Antimicrobial susceptibility testing. The MICs of TIG, tetracycline, minocycline, doxycycline, quinupristin-dalfopristin, vancomycin, teicoplanin, chloramphenicol, ampicillin, linezolid, ciprofloxacin, and gentamicin were determined by the broth microdilution method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (17). The dilution series of antibiotics were from 32 to 0.003 μg/ml for all antibiotics except ampicillin and gentamicin, for which concentrations from 1.024 to 1 μg/ml were used. The MH medium used (BD, Sparks, MD, USA) is adjusted to provide 20 to 25 mg per liter of calcium and 10 to 12.5 mg per liter of magnesium, and TIG was prepared extemporaneously. The MICs of TIG were also evaluated using Etest strips (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The agar dilution method was used to determine the MICs of TIG in the presence of the efflux pump inhibitor (EPI) reserpine (10 or 50 μg/ml), a very well-known EPI in Gram-positive bacteria (18), or the proton pump inhibitor pantoprazole (10 μg/ml). From 1 to 0.01 μg/ml of TIG was added to MH agar plates, and a spot of 10 μl of the cell suspensions (0.5 McFarland standards) was inoculated onto the surface. Plates containing 500 μl dimethyl sulfoxide (which was used to dissolve reserpine) were used as controls. Incubations were performed at 37°C for 18 h.

Whole-genome sequencing and comparative genomic analysis. The complete genome sequence of the AusTig mutant was obtained by high-throughput sequencing, using an Illumina MiSeq benchtop sequencer (ProfileXpert-LCMT, Lyon, France), from libraries constructed from genomic DNA purified with a NucleoSpin tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Thus, about 5 million reads (each of which was 61 bp long), corresponding to a 100-fold coverage of the *E. faecium* Aus0004 genome, were obtained. To identify single nucleotide polymorphisms (SNPs), comparative genomic analysis was performed, using CLC Genomics WorkBench software (Qiagen, Valencia, CA), by comparison of the sequences with the annotated sequence of the *E. faecium* Aus0004 wild-type strain (GenBank accession no. NC_017022) (14). The nucleotide and deduced amino acid sequences were analyzed using the BLASTN and BLASTX programs, available over the Internet at the National Center for Biotechnology Information website (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

General DNA manipulations. The primers used for this work are listed in Table 2. PCR products and plasmids were purified using a QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and a NucleoSpin plasmid kit (Macherey-Nagel), respectively. Restriction endonucleases and T4 DNA ligase were purchased from Promega (Madison, WI, USA) and used according to the manufacturer's instructions. For the detection of the different *ret* genes (M, K, L, O, S, T, U, and X), genomic DNA was extracted with an InstaGene kit (Bio-Rad, Hercules, CA) and PCR was performed

TABLE 2 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3') ^a		Function
	Forward	Reverse	
1228_Seq	TGAGGAAGGTGTGGATCTGA	GCAATGGGTTGAAGGGATAA	Sequencing
RpsI_Seq	AGAGGTTGGACACGCCCGG	TCTACAACAGTTACTGGAAT	Sequencing
1636_Seq	GTGGAACATAGCGAAAGTATT	TCATGCGGTGGCGCACCTCC	Sequencing
2455_Seq	GATGAAAGAAGGATCTACTATG	ACTGACAGCTTCCAAGGAGC	Sequencing
RpsI_U	AAAGGATCCTACGCTGAAGCTGGAGACAACATTGG	AATGGTACCGTTTTGCCATCTTGTCCCTCCTTC	Cloning in pWS3
RpsI_D	TAAGGTACCAACTAAAAAATAATGGAGGTG	AAAACTAGTACGATTGCATCGTAAACAACACTTTC	Cloning in pWS3
1228_U	CCGGGATCCGAATTCAAAATCATGGATTACATTTTCTC	TCGTGCTTACTGCTACAGACAAATCCCAATACCAA	Cloning in pWS3
1228_D	TAGCAGTAACGACGATCGT	GCAGGTCGACGAATTCAAAATCTGCTTGTCTTCTGCA	Cloning in pWS3
pWS3	TTTCCAGTCACGACGTTGT	ACTGACAGCTTCCAAGGAGC	Cloning verification
Tet(S)	GACTGTGAATCTAAATTTGAAACC	GCACAATTCGTGAGTTACTGT	PCR detection
Tet(T)	TAGCACATGTTGATGCGAGGT	TATCATCCCTTACATTTGTC	PCR detection
Tet(U)	CAAAAGAAATCGATACGTGG	CGTCTGCAGATTCCTTAAAAGTC	PCR detection
Tet(L)	CATTTTGGTCTTATTGGATCG	ATTAGACTTCGGATTTCCGG	PCR detection
Tet(M)	ACAGAAAGCTTATTATATAAC	TGGCGTGTCTATGATGTTTAC	PCR detection
Tet(K)	TATTTTGGCTTTGATTTCTTTTCAT	GCTATACCTGTCCCTCTGATAA	PCR detection
Tet(O)	GATGGCATACAGGCACAGAC	CAATATCACCAGAGCAGGCT	PCR detection
Tet(X)	CAATAATTGGTGGGACCC	TTCTTACCTGGACATCCCG	PCR detection

^aThe underlined sequences correspond to restriction enzyme recognition sites (BamHI, GGATCC; KpnI, GGTACC; EcoRI, GAATTC).

using GoTaq DNA polymerase (Promega), as recommended by the supplier. PCR products were sequenced in both directions (GATC Biotech, Constance, Germany).

Construction of deletion mutants. For the construction of the Δ efau004_01228 strain and in an attempt to delete the *efau004_00094* gene, allelic replacements were carried out as previously described (19). Briefly, DNA fragments (obtained by PCR with the chromosomal DNA of *E. faecium* Aus0004 as the template) containing ligated upstream and downstream sequences of the desired deletion fragment were cloned into the thermosensitive replication plasmid pWS3 (20) (Table 1), and 1 μ g of recombinant plasmid was used to transform *E. faecium* Aus0004 competent cells by electroporation. Single-crossover transformants (spectinomycin-resistant colonies) were used for temperature shifts in order to release the plasmid. Candidate clones resulting from a double-crossover event were isolated on BHI agar with or without spectinomycin (300 μ g/ml). In antibiotic-susceptible clones, the loss of the plasmid and the deletion were verified by PCR and sequencing.

RESULTS

Antibiotic susceptibility profiles. Three mutants, mutant AusTig and mutants HMtig1 and HMtig2, with reduced TIG susceptibility were obtained *in vitro* from the Aus0004 and HM1070 *E. faecium* wild-type strains, respectively. The MICs of TIG against derivative mutants (0.25 μ g/ml) were 8-fold higher than those against the corresponding parental strains (0.03 μ g/ml) (Table 3). Interestingly, the diminished susceptibility appeared to be stable since the MICs of TIG remained at 0.25 μ g/ml for the three mutants over 2 weeks without selective pressure. The derivative mutants also appeared to be significantly less susceptible to the classical tetracyclines than wild-type strains Aus0004 and HM1070, with 4- to 8-fold increases in the MICs of doxycycline, minocycline, and tetracycline being detected (Table 3). No changes in the MICs for any other antimicrobial agents tested, including genta-

TABLE 3 MICs of antimicrobial agents against *E. faecium* strains

Antibiotic ^a	MIC ^b (μ g/ml)						
	Aus0004 <i>vanB tet(M)</i> ^c	AusTig <i>vanB tet(M)</i>	HM1070	HMtig1	HMtig2	EF16 <i>vanA tet(M)</i>	EF22 <i>vanA tet(M) tet(L)</i>
CHL	16 ^e	16	4	2	2	16	16
VAN	16	16	0.5	0.5	1	>32	>32
TEC	2	2	0.5	1	1	>32	>32
LZD	4	4	2	4	4	4	4
Q-D	1	1	0.25	0.5	0.5	2	1
AMP	256	256	<1	<1	<1	1,024	1,024
CIP	2	4	2	2	2	>32	>32
GEN	8	8	2	2	2	512	4
TET	0.25	1^d	0.25	1	2	>32	16
DOX	0.25	1	0.25	1	2	8	4
MIN	0.06	0.25	0.12	0.5	0.5	32	0.5
TIG ^c	0.03	0.25	0.03	0.25	0.25	0.5	0.25

^a CHL, chloramphenicol; VAN, vancomycin; TEC, teicoplanin; LZD, linezolid; Q-D, quinupristin-dalfopristin; AMP, ampicillin; CIP, ciprofloxacin; GEN, gentamicin; TET, tetracycline; DOX, doxycycline; MIN, minocycline; TIG, tigecycline.

^b MICs were determined both by microdilution and by Etest (similar results). Values underlined and in boldface are at least 4-fold higher than those for the corresponding parental strain.

^c The *ter* genes were detected by PCR (see Materials and Methods).

TABLE 4 Sequence changes in the AusTig mutant compared to the sequence of wild-type strain *E. faecium* Aus0004^a

Gene	Product	Nucleotide change (position)	Predicted amino acid change
<i>efau004_00094</i>	S10 protein of the 30S ribosomal subunit	G → T (97,523)	Asp60 → Tyr
<i>efau004_01228</i>	Cation transporter	T → A (1,257,670)	Asn80 → Ile
<i>efau004_01636</i>	Hypothetical protein	G → T (1,651,985)	Val54 → Leu
<i>efau004_02455</i>	l-Lactate oxidase	G → A (2,474,071)	Ala100 → Thr

^a Gene names and nucleotide positions are from the annotated sequence of the *E. faecium* Aus0004 strain (GenBank accession no. NC_017022) (14).

micin, which also targets the 30S subunit of the ribosome, were observed (Table 3). Finally, no decrease of TIG MICs was observed in the presence of an EPI (reserpine or pantoprazole), whatever the strain tested (data not shown), suggesting that the MIC increase was probably not associated with an efflux mechanism. Of note, the growth kinetic rates of the *in vitro* mutants were similar to those of the corresponding parental strains under standard growth conditions in BHI medium at 37°C (data not shown).

In addition, two *vanA*-positive VRE clinical isolates (EF16 and EF22) were found to have reduced susceptibility to TIG (MICs, 0.5 µg/ml and 0.25 µg/ml, respectively) and were resistant to the majority of antibiotics tested (Table 3). Note that EF16 is the first *E. faecium* clinical isolate not susceptible to TIG (EUCAST susceptibility breakpoint, ≤0.25 µg/ml [http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/]).

Detection of *tet* genes. Tetracycline resistance is usually caused by the acquisition of resistance determinants encoded by the *tet* genes, which mediate either active efflux or ribosomal protection (21). Among them, seven genes have been retrieved in enterococci so far: *tet(K)* and *tet(L)*, which are involved in efflux, and *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(T)*, and *tet(U)*, which encode ribosomal protection proteins (22). We also tested for the presence of the *tet(X)* gene, which encodes an oxygen-dependent monooxygenase conferring tetracycline resistance in *Bacteroides fragilis*, as previously described (11). By PCR, the presence of the *tet(M)* gene was found in the genome of Aus0004 (and its corresponding mutant, AusTig) and EF16, whereas both *tet(L)* and *tet(O)* were detected in that of EF22 (Table 3). Surprisingly, despite the presence of these two *tet* genes, the MIC of minocycline against EF22 appeared to be low (0.5 µg/ml), while the MICs of other tetracyclines were lower than the MIC for strain EF16, which harbors only *tet(M)* (Table 3). Of note, Aus0004 and its derived mutant, AusTig, remained susceptible to tetracyclines, despite the presence of *tet(M)*. This could be due to the insertion of a group of three genes (*efau004_00064*, *efau004_00065*, and *efau004_00066*) that likely inactivate the locus (14).

Genomic analysis of reduced TIG susceptibility. By comparative genomic analysis of the sequence of mutant AusTig with that of the parental strain (Aus0004), four different nucleotide substitutions were identified and verified by resequencing (Table 4). The mutation localized at position 97,523 affected the *rpsJ* gene (*efau004_00094*), coding for the S10 protein of the 30S ribosomal subunit, by creating an Asp60Tyr substitution. The second mutation was observed in the *efau004_01228* gene, leading to an Asn80Ile substitution in the amino acid sequence of the protein annotated as a cation transporter (an E1-E2 family ATPase). Be-

cause *efau004_01228* encodes an ATP-driven pump involved in the transmembrane transport of charged substrates, it was tempting to speculate that it could play a role in the efflux of TIG (even if the findings of phenotypic tests with reserpine or pantoprazole went against this speculation). We then constructed the corresponding deletion mutant and tested its susceptibility to TIG, but no difference in the MIC compared to that of the parental strain was observed. Our genomic analysis also revealed a Val54Leu substitution in the hypothetical protein EFAU004_01636 without putative conserved domains as well as an Ala100Thr substitution in the sequence of the l-lactate oxidase (EFAU004_02455), which is an enzyme that participates in pyruvate metabolism in the presence of oxygen.

In order to determine the role of one or more of these mutations, additional *E. faecium* strains (*in vitro* mutants HMTig1 and HMTig2 from HM1070, clinical isolates EF16 and EF22) were tested by PCR amplification and sequencing. It appeared that *efau004_01636* was present only in strain Aus0004 (and in its derivative, AusTig). Indeed, no PCR amplification of this gene was detected for the other *E. faecium* strains tested, suggesting that it is likely part of the accessory genome. Note that a BLAST search did not find *efau004_01636* in any enterococcal genome except that of Aus0004 strain. For all the additional strains tested, the amino acid sequences of the proteins encoded by *efau004_01228* (cation transporter) or *efau004_02425* (l-lactate oxidase) were identical to those of the proteins from the Aus0004 wild-type strain. On the other hand, compared to the sequences of the two TIG-susceptible strains (Aus0004 and HM1070), four of the five strains exhibiting reduced TIG susceptibility possessed an amino acid substitution in the *rpsJ* sequence (Fig. 1). As was observed for the AusTig mutant, the HMTig1 and HMTig2 *in vitro* mutants showed an Asp60Tyr modification, whereas the EF16 clinical isolate had a Lys57Glu substitution. This strongly suggests that alteration of *rpsJ* could be (at least partially) responsible for TIG resistance in *E. faecium*. Thus, we sought to evaluate the role of these loci in TIG-susceptible wild-type *E. faecium*. We tried several times to construct an *rpsJ* deletion mutant, but all attempts failed, suggesting that *rpsJ* is likely essential for *E. faecium*.

DISCUSSION

Since 2005, TIG has been approved for use for the treatment of complicated intra-abdominal infections, skin and skin structure infections, and pneumonia. Because TIG overcomes ribosomal protection and active efflux mechanisms that confer resistance to classical tetracyclines, it has attracted particular interest for the treatment of infections caused by multidrug-resistant (MDR) strains. However, reports of clinical resistance to TIG have recently increased, especially among isolates of *A. baumannii* and the *Enterobacteriaceae* (8). In contrast, TIG resistance remains seldom reported in Gram-positive bacteria, even if some intermediate or resistant strains have been described in *Staphylococcus* spp. and *Enterococcus* spp., but it has never been detected in *E. faecium* (8, 10–12, 23). The first clinical isolate of *E. faecalis* resistant to TIG (MIC, 1 µg/ml) was found in 2008 (11). Moreover, among 208 Gram-positive strains isolated from patients with secondary peritonitis, 18.9% of *E. faecalis* isolates were categorized as intermediate or resistant (MICs, 0.25 to 1 µg/ml), whereas no nonsusceptible *E. faecium* isolates were found (24). In a recent Portuguese study, several nonsusceptible enterococcal strains (MIC range, 0.5 to 1 µg/ml) were detected from hospitalized patients (2

Aus004	MAKQKIRIRL	KAYEHRILDQ	SADKIVETAK	RTGASVSGPI	PLPTERSLYT	IIRATHKYKD	60
HM1070	MAKQKIRIRL	KAYEHRILDQ	SADKIVETAK	RTGASVSGPI	PLPTERSLYT	IIRATHKYKD	60
AusTig	MAKQKIRIRL	KAYEHRILDQ	SADKIVETAK	RTGASVSGPI	PLPTERSLYT	IIRATHKYKY	60
HMtig1	MAKQKIRIRL	KAYEHRILDQ	SADKIVETAK	RTGASVSGPI	PLPTERSLYT	IIRATHKYKY	60
HMtig2	MAKQKIRIRL	KAYEHRILDQ	SADKIVETAK	RTGASVSGPI	PLPTERSLYT	IIRATHKYKY	60
EF16	MAKQKIRIRL	KAYEHRILDQ	SADKIVETAK	RTGASVSGPI	PLPTERSLYT	IIRATHKYKD	60
EF22	MAKQKIRIRL	KAYEHRILDQ	SADKIVETAK	RTGASVSGPI	PLPTERSLYT	IIRATHKYKD	60
Aus004	SREQFEMRTH	KRLIDIVNPT	PKTVDALMKL	DLPSGVNIEI	KL	102	
HM1070	SREQFEMRTH	KRLIDIVNPT	PKTVDALMKL	DLPSGVNIEI	KL	102	
AusTig	SREQFEMRTH	KRLIDIVNPT	PKTVDALMKL	DLPSGVNIEI	KL	102	
HMtig1	SREQFEMRTH	KRLIDIVNPT	PKTVDALMKL	DLPSGVNIEI	KL	102	
HMtig2	SREQFEMRTH	KRLIDIVNPT	PKTVDALMKL	DLPSGVNIEI	KL	102	
EF16	SREQFEMRTH	KRLIDIVNPT	PKTVDALMKL	DLPSGVNIEI	KL	102	
EF22	SREQFEMRTH	KRLIDIVNPT	PKTVDALMKL	DLPSGVNIEI	KL	102	

FIG 1 Alignment of RpsJ sequences from *E. faecium* strains. Mutant AusTig and mutants HMtig1 and HMtig2 are *in vitro* mutants from the *E. faecium* Aus004 and HM1070 wild-type strains, respectively. EF16 and EF22 are *vanA*-positive *E. faecium* clinical isolates. Amino acid substitutions (compared to the sequences of the wild-type strains) are indicated in bold.

E. faecalis strains), healthy humans (2 *E. faecalis* strains), and food products (3 *E. faecalis* strains, 1 *Enterococcus hirae* strain, 1 *Enterococcus gallinarum* strain, and 1 other strain) (12). A recent study from the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST) revealed that all *E. faecium* strains isolated in the Middle East and Africa recovered between 2004 and 2011 remained susceptible to TIG and linezolid, including VRE isolates (25). The lack of *E. faecium* clinical isolates intermediate or resistant to TIG correlates well with the fact that it was tedious to select nonsusceptible mutants (with a maximum MIC of 0.25 µg/ml) *in vitro*. Note that higher MICs may arise clinically since EF16 showed a MIC of 0.5 µg/ml. It is likely that the ability to acquire better resistance to TIG is strain dependent. This has also been observed for *S. aureus*, where attempts to select mutants of strain 8325-4 were unsuccessful, whereas *in vitro* Mu3 and N315 mutants with MICs of 16 µg/ml and 4 µg/ml, respectively, were obtained (10).

As opposed to Gram-negative organisms and *S. aureus*, for which resistance is mainly related to overexpression of efflux pump systems (8, 10), this mechanism did not seem to occur in *E. faecium*, since the presence of an EPI did not affect TIG susceptibility. Similar results were observed with a TIG-resistant strain of *E. faecalis* (11).

By whole-genome analysis, we were able to characterize for the first time genetic determinants associated with reduced TIG susceptibility in enterococci. Only four mutations leading to amino acid substitutions (in *efau004_00094*, *efau004_01228*, *efau004_01636*, and *efau004_02425*) were identified in the genome of an *in vitro* mutant with reduced TIG susceptibility (AusTig) and were considered good candidates. Because the *efau004_01228* mutant showed the same TIG MIC as the wild-type strain, *efau004_01636* was found only in Aus004 and its derivative strains, and *efau004_02425*, which encodes lactate oxidase, is a metabolic enzyme without a link with the translation pathway, the mutation in *efau004_00094*, coding for RpsJ (S10 ribosomal protein), could have an important influence on decreased susceptibility to TIG. In order to support this hypothesis, we analyzed the sequences of these four genes in different strains less susceptible to TIG. Only modifications in RpsJ were identified in four of the five strains with reduced susceptibility to TIG. The small S10 protein is a component of the 30S subunit that is the target of the antibiotic, which thus impedes protein synthesis. Interestingly, in *E. coli*, protein S10

also participates (together with the NusB protein) in processive transcription antitermination of rRNA operons and thus plays a role in the feedback control of ribosome biogenesis (26). In this context, it is suspected that the only function of NusB in antitermination is that of an adaptor facilitating the interaction between S10 and the transcription elongation complex. S10 qualifies as a moonlight protein, since its transcriptional activity is independent of ribosome binding (near the aminoacyl-tRNA site in the structure of the 30S subunit) (27). For both activities, the S10 loop (residues 46 to 67) is of architectural importance (26). The *rpsJ* gene is present in a single copy in the genome of *E. faecium* and is probably essential for the bacteria. Therefore, as expected, no corresponding mutant could be obtained. In *K. pneumoniae*, it seems that the inactivation of the *ramR* gene (coding for an indirect negative regulator of the *acrAB* operon) is the most common mechanism conferring resistance to TIG (28). Nevertheless, it has recently been demonstrated that the resistance to TIG of the KPC-producing *K. pneumoniae* KP4-R strain was due to a Val57Leu substitution in the RpsJ protein sequence (28). Moreover, as for the strains used in this study, the efflux did not appear to be involved in TIG resistance, pointing out that structural alteration of the ribosomal protein S10 in the drug target site may be a potential novel mechanism. However, since such a substitution was not present in the EF22 strain, some other mechanism(s) should be involved in the reduced susceptibility to TIG in *E. faecium* and remains to be elucidated.

In *Neisseria gonorrhoeae*, in combination with the *mtrR* and *penB* resistance determinants, the mutation that maps to the vertex of a loop in S10 was also shown to be associated with tetracycline resistance (29). In addition, in *Bacillus subtilis* bearing mutations in *tet(A)* and *tet(B)*, the Lys46Glu substitution in the S10 protein sequence confers high-level resistance to tetracyclines (30). It was therefore tempting to speculate that the reduced susceptibility to TIG can affect the MICs of other tetracyclines. Interestingly, we observed that *in vitro* mutant strains also became more resistant to doxycycline, minocycline, and tetracycline independently of the presence of the *tet* gene. It therefore appears that altered RpsJ may be one of the determinants of resistance to tetracyclines, acting by reducing the affinity of the antibiotic for its ribosomal target. The analysis of the *rpsJ* sequence, in addition to the screening of *tet* genes, should therefore be undertaken for clinical isolates exhibiting resistance to tetracyclines. This point seems

to be relevant, since classical tetracyclines (but not TIG), which are extensively used in veterinary medicine, might constitute a selective pressure for the emergence of TIG-nonsusceptible strains (12).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (EA4655) and the 7th Framework European Program TROCAR.

The expert technical assistance of Michel Auzou was greatly appreciated.

We all read and approved the manuscript, and we declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Arias CA, Murray BE. 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 10:266–278. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2761>.
- Top J, Willems R, Bonten M. 2008. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium* from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52:297–308. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00383.x>.
- Cattoir V, Giard JC. 2014. Antibiotic resistance in *Enterococcus faecium* clinical isolates. *Expert Rev Anti Infect Ther* 12:239–248. <http://dx.doi.org/10.1586/147872.10.2014.870886>.
- Noskin GA. 2005. Tigecycline: a new glycolcycline for treatment of serious infections. *Clin Infect Dis* 41:S303–S314. <http://dx.doi.org/10.1086/431672>.
- Wenzel R, Bate G, Kirkpatrick P. 2005. Tigecycline. *Nat Rev Drug Discov* 4:809–810. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1857>.
- Bauer G, Berens C, Projan SJ, Hillen W. 2004. Comparison of tetracycline and tigecycline binding to ribosomes mapped by dimethylsulphate and drug-directed Fe²⁺ cleavage of 16S rRNA. *J Antimicrob Chemother* 53:592–599. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkh125>.
- Keeney D, Ruzin A, McAleese F, Murphy E, Bradford PA. 2008. MarA-mediated overexpression of the AcrAB efflux pump results in decreased susceptibility to tigecycline in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 61:46–53. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm397>.
- Sun Y, Cai Y, Liu X, Bai N, Liang B, Wang R. 2013. The emergence of clinical resistance to tigecycline. *Int J Antimicrob Agents* 41:110–116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.09.005>.
- Veleba M, Higgins PG, Gonzalez G, Seifert H, Schneiders T. 2012. Characterization of RarA, a novel AraC family multidrug resistance regulator in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 56:4450–4458. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00456-12>.
- McAleese F, Petersen P, Ruzin A, Dunman PM, Murphy E, Projan SJ, Bradford PA. 2005. A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* mutants to tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1865–1871. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.5.1865-1871.2005>.
- Werner G, Gfrörer S, Fleige C, Witte W, Klare I. 2008. Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German intensive care unit patient. *J Antimicrob Chemother* 61:1182–1183. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkn065>.
- Freitas AR, Novais C, Correia R, Monteiro M, Coque TM, Peixe L. 2011. Non-susceptibility to tigecycline in enterococci from hospitalised patients, food products and community sources. *Int J Antimicrob Agents* 38:174–176. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.04.014>.
- Cattoir V, Bucquet F, Giard J-C. 2014. Genomic analysis of reduced susceptibility to tigecycline in *Enterococcus faecium*, abstr. C-843. Abstr 54th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Lam MM, Seemann T, Bulach DM, Gladman SL, Chen H, Haring V, Moore RJ, Ballard S, Grayson ML, Johnson PD, Howden BP, Stinear TP. 2012. Comparative analysis of the first complete *Enterococcus faecium* genome. *J Bacteriol* 194:2334–2341. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00259-12>.
- Bozdogan B, Leclercq R. 1999. Effects of genes encoding resistance to streptogramins A and B on the activity of quinupristin-dalfopristin against *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2720–2725.
- Leenhouts K, Buist G, Bolhuis A, ten Berge A, Kiel J, Mierau I, Dabrowska M, Venema G, Kok J. 1996. A general system for generating unlabelled gene replacements in bacterial chromosomes. *Mol Gen Genet* 253:217–224. <http://dx.doi.org/10.1007/s004380050315>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; approved standard, 23rd ed, M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Ahmed M, Borsch CM, Neyfakh AA, Schuldiner S. 1993. Mutants of the *Bacillus subtilis* multidrug transporter Bmr with altered sensitivity to the antihypertensive alkaloid reserpine. *J Biol Chem* 268:11086–11089.
- Lebreton F, van Schaik W, Sanguinetti M, Posteraro B, Torelli R, Le Bras F, Verneuil N, Zhang X, Giard JC, Dhalluin A, Willems RJ, Leclercq R, Cattoir V. 2012. AsrR is an oxidative stress sensing regulator modulating *Enterococcus faecium* opportunistic traits, antimicrobial resistance, and pathogenicity. *PLoS Pathog* 8:e1002834. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002834>.
- Zhang X, Vrijenhoek JE, Bonten MJ, Willems RJ, van Schaik W. 2011. A genetic element present on megaplasmids allows *Enterococcus faecium* to use raffinose as carbon source. *Environ Microbiol* 13:518–528. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02355.x>.
- Poyart C. 2010. Tetracyclines, p 327–337. In Courvalin P, Leclercq R, Rice LB (ed), *Antibiogram*. ASM Press, Washington, DC.
- Nishimoto Y, Kobayashi N, Alam MM, Ishino M, Uehara N, Watanabe N. 2005. Analysis of the prevalence of tetracycline resistance genes in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a Japanese hospital. *Microb Drug Resist* 11:146–153. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2005.11.146>.
- Stein GE, Babinchak T. 2013. Tigecycline: an update. *Diagn Microbiol Infect Dis* 75:331–336. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.12.004>.
- Tubau F, Linares J, Rodriguez MD, Cercenado E, Aldea MJ, González-Romo F, Torroba L, Berdonces P, Plazas J, Aguilar L, Delgado A, García-Escribano N, Study Group. 2010. Susceptibility to tigecycline of isolates from samples collected in hospitalized patients with secondary peritonitis undergoing surgery. *Diagn Microbiol Infect Dis* 66:308–313. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.10.018>.
- Kanj SS, Whitelaw A, Dowzicky MJ. 2014. In vitro activity of tigecycline and comparators against Gram-positive and Gram-negative isolates collected from the Middle East and Africa between 2004 and 2011. *Int J Antimicrob Agents* 43:170–178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.10.011>.
- Luo X, Hsiao HH, Bubunenko M, Weber G, Court DL, Gottesman ME, Urlaub H, Wahl MC. 2008. Structural and functional analysis of the *E. coli* NusB-S10 transcription antitermination complex. *Mol Cell* 32:791–802. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.028>.
- Weisberg RA. 2008. Transcription by moonlight: structural basis of an extraribosomal activity of ribosomal protein S10. *Mol Cell* 32:747–748. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2008.12.010>.
- Villa L, Feudi C, Fortini D, García-Fernández A, Carattoli A. 2014. Genomics of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 512 clone highlights the role of RamR and ribosomal S10 protein mutations in conferring tigecycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 58:1707–1712. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01803-13>.
- Hu M, Nandi S, Davies C, Nicholas RA. 2005. High-level chromosomally mediated tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* results from a point mutation in the *rpsJ* gene encoding ribosomal protein S10 in combination with the *mtrR* and *penB* resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4327–4334. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.10.4327-4334.2005>.
- Williams G, Smith I. 1979. Chromosomal mutations causing resistance to tetracycline in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* 177:23–29. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00267249>.

2. Impact des xénobiotiques non-antibiotiques sur *E. faecium*

2.1. Publication 3 : Etude de l'impact des xénobiotiques *a priori* non-antibiotiques sur la physiologie de *E. faecium*.

Contexte

Les infections sont une menace permanente et une cause majeure de décès pour les patients hospitalisés dans les services de réanimation. Ces infections sont responsables d'une morbi-mortalité et de coûts non négligeables puisqu'environ 50% des patients hospitalisés en réanimation développeront un syndrome infectieux et nécessiteront des gestes réanimatoires importants. Dans un contexte hospitalier particulier comme celui des services de réanimation, les infections sont généralement causées par un petit nombre d'espèces bactériennes (groupe ESKAPE) dont fait partie *E. faecium* (Vincent *et al.* 2009) et qui sont généralement résistantes à de nombreuses classes d'antibiotiques. Alors que 70% des patients hospitalisés en réanimation reçoivent des antibiotiques (en curatif ou préventif), d'autres molécules thérapeutiques sont très largement utilisées comme les catécholamines, les anxiolytiques, les analgésiques, les anticoagulants, les antiacides, les curarisants ou encore les antifongiques. Si les effets des antibiotiques sur la physiologie bactérienne sont très largement connus et documentés dans la littérature, l'impact des molécules *a priori* non-antibiotiques est peu étudié. L'objectif de ce projet a été de déterminer l'influence de différentes molécules non-antibiotiques très utilisées dans les services de réanimation sur un pathogène nosocomial majeur parfaitement adapté au milieu hospitalier, *E. faecium*. Nous avons donc décidé d'étudier l'effet de la norépinéphrine, de la morphine, du midazolam, de l'héparine non fractionnée (HNF), du pantoprazole, du paracétamol, de l'atracurium et de la caspofungine sur la physiologie de *E. faecium* d'un point de vue phénotypique mais aussi transcriptomique par la méthode RNA-seq (Hrdlickova *et al.* 2017). (Figure 27).

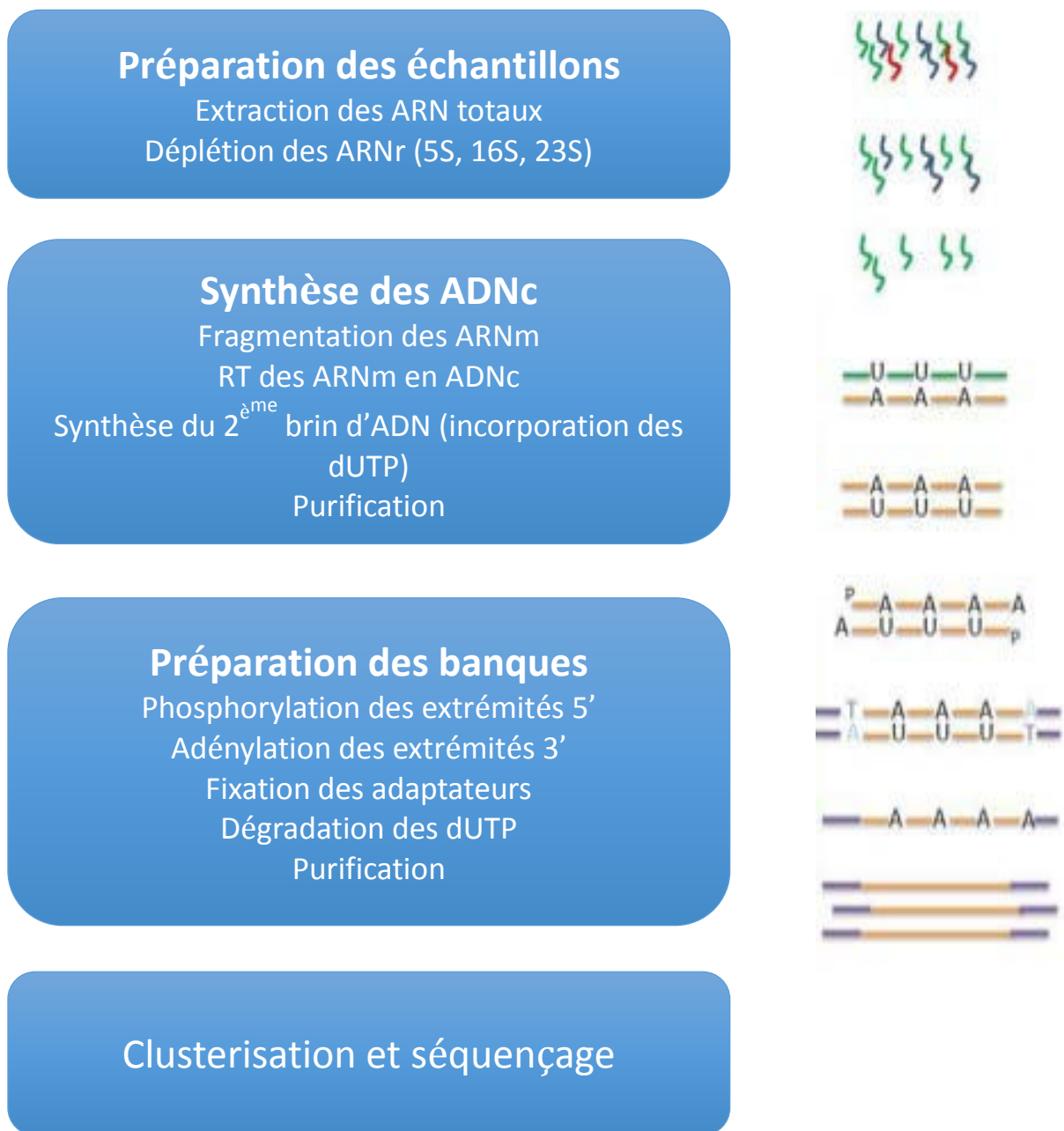


Figure 27. Principe de la technique RNA-seq selon la technologie Illumina®.

Résultats

Nous avons utilisé pour l'ensemble de cette étude la souche de référence *E. faecium* Aus0004, souche isolée à partir des hémocultures d'un patient australien en 1998, appartenant au complexe clonal CC17 et portant le gène *vanB* (Lam *et al.* 2012). Tout d'abord, une étude

phénotypique sur la croissance bactérienne en présence des molécules non-antibiotiques sélectionnées a été entreprise. Sur les 8 molécules testées à leurs concentrations plasmatiques attendues lors de traitement chez l'homme, seule la caspofungine semblait avoir un effet sur la croissance de Aus0004 en milieu Trypticase-Soja. A une concentration thérapeutique de 20 mg/L, la caspofungine inhibait totalement la croissance d'Aus0004. Cette observation a été confirmée par des expériences de bactéricidie avec des concentrations importantes de caspofungine (à $8 \times$ CMI).

Dans le but de pouvoir étudier son effet de façon plus précise, la CMI de la caspofungine vis-à-vis d'Aus0004 a été déterminée et toutes les expériences menées avec une concentration subinhibitrice ($1/4 \times$ CMI). Afin de s'affranchir de l'effet d'un quelconque adjuvant contenu dans la forme thérapeutique de la caspofungine (Cancidas[®], MSD), nous avons renouvelé l'expérience avec du diacétate de caspofungine (forme active seule) mais aussi avec une autre molécule de la classe des échinocandines, la micafungine. Là encore, un effet important sur la croissance bactérienne a été observé, laissant supposer un impact inattendu des antifongiques de la classe des échinocandines sur *E. faecium*. De façon intéressante, nous avons pu aussi observer qu'en présence de caspofungine dans le milieu de croissance, les CMI à la vancomycine de la souche Aus0004 augmentaient significativement d'un facteur 4 à 6, nous permettant de spéculer sur un impact de la caspofungine au niveau de la paroi bactérienne.

Afin de confirmer notre hypothèse, nous avons décidé d'analyser la paroi bactérienne en présence de caspofungine dans le milieu de croissance tant dans son aspect microscopique par des expériences de microscopie électronique mais aussi d'analyser de façon plus fine la composition du peptidoglycane par des expériences de chromatographie liquide ultra performante couplée à la spectrométrie de masse. Ici encore, les expériences de microscopie ont pu nous montrer que la paroi bactérienne semblait impactée par la présence de

caspofungine et que la composition du peptidoglycane et en particulier l'abondance de certains précurseurs de ce dernier l'était aussi.

Afin de déterminer l'impact global de la caspofungine sur le transcriptome de Aus0004, une étude de ce dernier par RNA-seq a alors été réalisée en présence/absence de la molécule. Les données transcriptomiques nous ont permis de voir qu'environ 20% du génome présentait des niveaux de transcription modifiés ($FC < -2 / > +2$, $P\text{-value} < 0,05$, 323 gènes induits et 245 gènes réprimés) et en particulier de nombreux gènes codant pour des protéines participant au métabolisme des hydrates de carbone (PTS) mais aussi jouant un rôle dans le métabolisme du pyruvate (opéron *pdhABCD*) ainsi que des gènes impliqués dans le métabolisme du glycérol (opéron *glpOKF*).

Conclusion

Ce travail représente la première étude phénotypique mais aussi transcriptomique de l'impact de xénobiotiques *a priori* non-antibiotiques, largement utilisés en réanimation, sur une bactérie particulièrement adaptée au milieu hospitalier, *E. faecium*. Les résultats obtenus nous ont permis de décrire pour la première fois que la caspofungine, molécule antifongique dont la cible moléculaire n'existe pas chez les procaryotes, avait un impact sur la croissance de Aus0004 mais également chez d'autres espèces à Gram positif comme *S. aureus* ou *E. faecalis*. Malheureusement, les données obtenues jusqu'ici ne nous permettent pas d'identifier une cible bien définie de cette molécule chez *E. faecium*.

Ce travail a fait l'objet d'une communication affichée lors de l'ECCMID 2016 (Amsterdam) dont le résumé est en annexe 2 et une publication internationale sera soumise prochainement dans la revue *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

Publication 3

Impact of caspofungin against *Enterococcus faecium*: deciphering the versatile effect of echinocandins.

Christophe Isnard, Sara B. Hernandez, Fanny Joalland, Didier Goux, François Guérin, François Gravey, Michel Auzou, David Enot, Pierrick Meignen, Felipe Cava, Vincent Cattoir

Article en cours de rédaction

Impact of caspofungin against *Enterococcus faecium*: deciphering the versatile effect of echinocandins.

Running title: Impact of caspofungin against *Enterococcus faecium*

Christophe Isnard^{a,b}, Sara B. Hernandez^c, Fanny Joalland^a, Didier Goux^d, François Guérin^{a,b}, François Gravey^b, Michel Auzou^{b,e}, David Enot^{f,g}, Pierrick Meignen^h, Felipe Cava^c, Vincent Cattoir^{e,i,j,#}

Université de Caen Normandie, EA4655 U2RM (équipe «Antibio-résistance»), Caen, 14033, France^a; CHU de Caen, Service de Microbiologie, Caen, 14033 France^b; Umeå University, MIMS - Laboratory for Molecular Infection Medicine Sweden, Department of Molecular Biology, Umeå, Sweden^c; Université de Caen Normandie, CMAbio, IBFA SF 4206 ICORE, Caen, 14033, France^d; CNR de la Résistance aux Antibiotiques (laboratoire associé 'Entérocoques'), Caen, 14033, France^e. Institut de Cancérologie Gustave Roussy Cancer Campus (GRCC), Villejuif, 94805, France^f; Metabolomics Platform, Institut Gustave Roussy, Villejuif, 94805, France^g; University of Caen Normandie, IUT (department "STID"), Lisieux, 14100, France^h; Unité Inserm U1230 - UPRES EA2311, Université de Rennes 1, Rennes, 35000 Franceⁱ; CHU de Rennes – Hôpital Ponchaillou, Service de Bactériologie-Hygiène hospitalière, Rennes, 35033 France^j.

Keywords: *E. faecium*, ESKAPE, VRE, caspofungin, echinocandins, bactericidal, vancomycin resistance, pathogenicity.

#Corresponding author. Prof. Vincent CATTOIR, Service de Bactériologie-Hygiène hospitalière, CHU de Rennes, Hôpital de Ponchaillou, 2 rue Henri Le Guilloux – 35033 RENNES Cedex Phone: +33 (0) 2 99 28 98 28. Fax: +33 (0) 2 99 28 41 59. E-mail: Vincent.CATTOIR@chu-rennes.fr

ABSTRACT

Enterococcus faecium belongs to the major opportunistic group of bacterial pathogens especially with the emergence of the CC17 lineage, which is well-adapted to the hospital environment and resistant to multiple antibiotics. As part of the gut microbiota, they must cope with numerous stress conditions such as the presence of antimicrobials non-antimicrobials, especially in patient hospitalized in intensive care units (ICUs). The aim of this study was to investigate the impact of the most prescribed xenobiotics in ICUs on fitness, pathogenicity and antimicrobial resistance of *E. faecium*. Several phenotypic analysis was processed and we rapidly brought to light that caspofungin, an antifungal agent belonging to the echinocandins family, seemed to have an important impact on *E. faecium* growth. First, we confirmed this result by electronic microscopy and a peptidoglycan analysis (UPLC-MS/MS). We then highlighted that caspofungin, even at subinhibitory concentrations (SICs), seemed to have an impact on cell wall organization especially in muropeptides precursors abundance. A transcriptomic analysis was also performed by RNA-seq (HiSeq 2500, Illumina) using the *vanB*-positive reference strain *E. faecium* Aus0004 in the presence or absence of caspofungin SIC (8 mg/L *i.e.*, 1/4 of the MIC). Transcriptomic analysis showed that in the presence of caspofungin SIC, approximately 20% of the *E. faecium* genome was altered with 55 genes significantly downregulated and 61 genes significantly upregulated. Since the fungal target of caspofungin was obviously absent in bacteria (*i.e.*, beta-(1,3)-glucan synthase), the mechanistic pathway of the caspofungin effect needed to be investigated. Regarding the repressed genes, the *pdhABCD* operon was largely downregulated (fold changes -4.3, -9.7, -6.9 and -6.4, respectively). This operon encoded components of the pyruvate deshydrogenase multienzyme complex involved in bacterial energetic pathway by the citrate cycle. Moreover, it seemed that the glycerol metabolism pathway and in particular the *glpOKF* operon was also significantly downregulated. The dramatic alteration of TCA

linked to the decrease of glycerol metabolism seemed to have a drastic impact on bacterial cells viability.

INTRODUCTION

Infections are one of the major threat for hospitalized patients, even more for patients in intensive care units (ICUs). They are responsible for an important increase of morbi-mortality rates and a burst of medical costs since approximately 50% of ICU patients will develop an infectious syndrome during their hospitalization and 60% of them will pass away of their infectious disease (1). While approximately 70% of noncardiac ICU patients will receive antibiotic molecules for preventive or curative indications during their stay, other molecules that are not antimicrobials will be largely used to cure these patients as inotropes, pain killers, anxiolytics, anticoagulants, gastrointestinal prophylaxis medications, curares or antifungal agents (2). It is well accepted now that adaptation of bacterial pathogens within their host can lead to important effects on their overall physiology but this question remains unclear concerning non-antibiotic xenobiotics, especially those administered in ICU patients. Several reports have been published in the literature concerning the impact of antibiotics on bacterial cell physiology, fitness, virulence and resistance, but little is known about the direct influence of non-antibiotic molecules on bacterial pathogens. In a previous report, it has been reported that xenobiotics shape the quantitative traits of human gut microbiota and affected the community gene expression (3). Moreover, it has been demonstrated that non-antibiotic therapy seemed to have significant effects upon bacterial cell physiology and virulence. For instance, catecholamine administration enhanced the bacterial growth, the biofilm formation and survival other traits of *P. aeruginosa* *in vivo* and *ex vivo* models (4). Rise of virulence traits in the presence of catecholamines has been described in other bacterial models such as *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. epidermidis* or *C. jejuni* (5–12). Recently, Babrowski & *al.* described the alteration of *P. aeruginosa* virulence in the presence of morphine, a major

analgesic molecule largely prescribed in ICUs, using a murine intestinal colonization model (13). Finally, it has been demonstrated that catecholamines promote the conjugative transfer of genes in enteric bacteria, suggesting a potential dissemination of resistance determinants in the microbiota of the gastrointestinal tract (14). In ICUs, patients are commonly colonized or infected by a small contingent of multidrug resistant isolates gathered under the acronym “ESKAPE bugs” for *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* spp. (1, 15). Initially considered as part of the commensal gastrointestinal tract microbiota, *E. faecium* raised as an important issue in therapeutic fields since multidrug resistant isolates emerged worldwide. Over the last decades, vancomycin resistant enterococci (VRE) isolates have emerged within the *E. faecium* species, particularly with spread lineage of hospital-adapted isolates belonging to the clonal complex CC17 (16–19). It has been described in a recent study comparing 51 *E. faecium* strains that CC17 strains belong to a particular epidemic lineage of hospital-adapted strains described as clade A1. This particular clade A1 is genetically distant from the community-associated lineage designed as clade B (18). Since few reports have been described on xenobiotic impact in Gram-negative bacteria, the impact of xenobiotics and in particular, *non-antibiotic* molecules used for the treatment and/or medical assistance of patients in ICUs, against *E. faecium* isolates remained undocumented. The aim of this study was then to describe the influence of the eight most prescribed non-antibiotic molecules in a noncardiac ICU on the physiology of *E. faecium* using the well characterized clinical CC17 hospital-adapted isolate Aus0004 (20). For that, we first decided to visualize phenotypically the impact of non-antibiotic molecules on *E. faecium* Aus0004 growth. Then, peptidoglycan (PG) analysis was performed using 1) Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) coupled with tandem Mass Spectrometry (MS/MS) analysis and 2) Scanning and Transmission Electronic Microscopy procedures (SEM/TEM). Finally, a transcriptomic

approach provided us the opportunity to have a snapshot on physiological consequences induced in vitro by xenobiotics present in the growth media. For that, we used the deep sequencing-based transcriptome analysis (RNA-seq) to oversee the level of transcripts variation in bacterial cells grown in the presence or absence of caspofungin (an antifungal agent). Using all those experiments and the data obtained, we uncovered several upheavals in the bacterial cell physiology in response to the presence of caspofungin, including an important decrease in the abundance of some muropeptides that generates PG deficiency and general cell wall abnormalities and a drastic impact on the energetic pathway of the cell.

RESULTS and DISCUSSION

Growth kinetics in the presence of eight non-antibiotic molecules. To assess the impact of eight non-antibiotic molecules highly prescribed in ICUs (see Material and Methods part for details), we decided first to observe their effect on *E. faecium* Aus0004 growth using a Trypticase-Soja broth (TSB) containing their awaiting human therapeutic serum concentrations. As shown in Figure. 1A, out of the eight molecules tested, only caspofungin seemed to have an important effect on *E. faecium* growth since a certain decrease of the growth rate in the exponential phase was observed with a time gap corresponding to approximately 2 hours appeared to reach the mid-log exponential phase compared to the growth in TSB alone. Note that in this experiment, a caspofungin concentration of 8 mg/L, (corresponding to ¼ of the Aus0004 MIC, referred as TS-CAS8) was used, since no growth was observed with the awaiting circulating serum rate. This result rose an important issue concerning the impact of caspofungin since no bacterial target was expected.

In order to feel free concerning an “adjuvant effect” in the pharmaceutical form of Cancidas[®], we decided to conduct the same experiment using the caspofungin diacetate salt

(Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, USA), the active form of pharmaceutical presentation alone. The same effect was fully retrieved with this chemical component (data not shown).

To attest if this observation on *E. faecium* fitness was specific to caspofungin or observed with other molecules belonging to the echinocandin family, the experiment was conducted using micafungin (Mycamine[®], Astellas Pharma, Levallois, France). Again, the same effect was observed (Fig. 1B). All these results emphasized that echinocandins seemed to have an impact on the bacterial growth of Aus0004. Regarding these results, we decided to determine the caspofungin impact on different Gram-positive bacteria such as *S. aureus* or *E. faecalis* (Fig. 1C) and Gram-negative species such as *P. aeruginosa*, *E. coli* and *E. cloacae* complex (Fig. 1D). The growth of all Gram-positive strains was affected in the presence of caspofungin (8 mg/L) whereas no differences were observed for the Gram-negative species. These findings allowed us to notify the impact of caspofungin on Gram positive bacteria and hypothesized that caspofungin might have a common target found in Gram positive cells. To our knowledge, the impact of cathecolamines has been described on growth enhancement of different bacteria such as *E. coli*, *Salmonella enterica* or *S. epidermidis* (10, 21, 22). However, the negative influence of non-antibiotic molecules on bacterial growth has not been described yet. Interestingly, in a previous study conducted with *S. aureus* strains, caspofungin seemed to do not have any impact in bacterial growth (23). In this study, caspofungin was used at an important concentration compared as the concentration used in our study and we can hypothesize that as described in fungi, caspofungin when used in a certain range of high concentrations paradoxically resume growth of significant number of susceptible strains of *S. aureus* (24–26).

In vitro mutants with decreased caspofungin susceptibility have been tried to be obtained from *E. faecium* Aus0004 after serial passages on MH agar supplemented with increasing concentrations of caspofungin and by the gradient method on agar medium as previously

described (27). Unfortunately, no resistant mutant was obtained to allow us to investigate the molecular target of caspofungin against *E. faecium* Aus0004.

Caspofungin influence on antimicrobial susceptibility and biofilm formation capacity of *E. faecium* Aus0004. Regarding our findings concerning *E. faecium* Aus0004 growth defect in the presence of echinocandins, we decided to look forward the effect on antimicrobial susceptibility of Aus0004 in the presence of antifungal agents. First, we determined MICs of amphotericin B, voriconazole, 5-fluoro-cytosine (5FC) and caspofungin against Aus0004 by the broth media dilution (BMD) method and obtained MICs of >1,024 mg/L, >1,024 mg/L, >1,024 mg/L and 32 mg/L, respectively. Interestingly, Aus0004 seemed to be less susceptible to vancomycin by the disk diffusion method when caspofungin was added in the Mueller-Hinton (MH) agar medium. This observation was confirmed by determining MICs of vancomycin by Etest, with an increase of 4-to-6-fold of the MIC when caspofungin was added at a concentration of 8 mg/L (Table 1). A rise of daptomycin MIC in the presence of caspofungin was also observed (4-fold greater than in MH agar alone). Impact of caspofungin on other antibiotics such as penicillins or aminoglycosides could not be observed since *E. faecium* Aus0004 harbored an acquired high resistance level to these molecules. None of the other antifungal agent led to any change in MICs of antibiotics tested (data not shown). To assess the role of the *van* operon in this increase of vancomycin MICs in the presence of caspofungin, the same experiment was performed using 4 *vanA*- and 4 *vanB*-positive strains of *E. faecium* obtained in our collection and also with 5 vancomycin-susceptible clinical isolates of *E. faecium*. Regardless the presence of *van* operon, we observed a moderate increase of vancomycin and daptomycin MICs in the presence of caspofungin (Table 1 and Fig. S1). These findings confirmed our hypothesis concerning a potential impact of echinocandins against cell wall components in *E. faecium* Aus0004

independently from the *van* operon. Note that those results were not observed with other classes of antifungal agents used in this study (*e.g.* amphotericin B, 5-fluorocytosine, and voriconazole).

To ascertain the impact of caspofungin administration in hospital routinely used products, MICs of four broadly-consumed antiseptics were determined in the presence of sub-inhibitory concentrations of caspofungin. No difference in MICs was observed with benzalkonium chloride, polyvidone iodine and tetraphenylphosphonium chloride whereas a 2-to-4-fold increase in chlorhexidine MIC was observed in the presence of 4 mg/L and 8 mg/L of caspofungin, respectively.

This is well known that bacterial biofilms pose a significant medical challenge because they are difficult to treat using standard therapeutic approaches, given that bacterial biofilms are a major barrier to antibiotic effectiveness and are a well-known virulence factor especially in hospital adapted, multi-resistant *Enterococcus faecium* strains [Willems & al. Lancet 2001]. In order to characterize the biofilm inhibitory effect of caspofungin in our bacterial model as described in fungal experiment (28), we decided to observe the biofilm formation of *E. faecium* Aus0004 (used as slightly biofilm formation strain) and *E. faecium* HM1070 Δ *asrR* (a biofilm positive control mutant) (29), in the presence of sub-inhibitory concentrations of caspofungin. As retrieved in fungal experimentation, caspofungin statistically reduced the biofilm formation of the positive control whereas no difference was observed in the negative control strain Aus0004 (Fig. 2). These data substantiated previous findings concerning caspofungin impact against bacterial biofilm found in *S. aureus* (23). Interestingly, the authors explained that this biofilm formation shutdown in *S. aureus* was mediated through inhibition of the *ica* operon by caspofungin and in particular, IcaA, protein which shares homology with β -1-3-glucan synthase, the caspofungin fungal target. Herein, the protein which shares homology with IcaA (*e.g.* AUS0004_00389) and also all the *ica* operon

homolog genes seemed to be not impacted by the presence of caspofungin as retrieved in our transcriptomic analysis.

Highlighting the bactericidal effect of caspofungin against *E. faecium*. In order to confirm our observations concerning the impact of caspofungin on *E. faecium* growth, we decided to characterize the bactericidal effect of the molecule using a time-kill curve experiments with different anti-Gram-positive antibiotics as comparators as shown in Figure 3. Interestingly, we observed a fast and important decrease of the 10^6 UFC/ml initial inoculum (>99.9%) after only 3 hours of incubation, in the presence of caspofungin at a concentration corresponding to 8 fold MIC. The bactericidal effect of caspofungin was confirmed during the 24 hours of the experiment without any regrowth. Note that the same result was obtained in approximately 7 hours in the presence of daptomycin, a well characterized bactericidal antibiotic, active against Gram-positive bacteria (19, 30). In our experiment, vancomycin seemed to have a bacteriostatic effect since the strain Aus0004 carried a *vanB* gene leading to a low level acquired resistance. As expected, linezolid seemed to have a slight effect in *E. faecium* proliferation due to its bacteriostatic activity (31). These unexpected observations (since fungal caspofungin target β -1-3 glucan synthase does not exist in prokaryotes) allowed us to speculate on a bactericidal effect of caspofungin against Aus0004 and in its potential interest as antibacterial agent since biofilm formation was also disrupted as retrieved in conventional anti-Gram-positive antibiotics like daptomycin for example (32, 33).

Ultrastructural morphology analysis. In order to characterize the impact of the eight molecules against cell wall components, and potentially observed a cell morphology modification, SEM and TEM experiments were performed using the Aus0004 strain with the molecules added in the culture broth until the late-exponential phase (7 hours). Among the 8 molecules used, SEM experiments revealed that caspofungin was responsible for serious morphological abnormalities of the bacterial surface, suggesting a strong effect on bacterial

cell wall as shown in Fig. 4A. These data were partially confirmed by the TEM experiments that revealed decrease of the cell wall membrane thickness in the presence of caspofungin (Fig 4B).

Peptidoglycan composition and muropeptides analysis. To confirm our EM results, peptidoglycan (PG) precursors analysis of Aus0004 in the presence of a sub-inhibitory concentration of caspofungin at different times of growth (exponential phase, exponential-stationary phase, stationary phase) was accessed by UPLC and muropeptides identification was processed by MS/MS analysis. Muropeptides composition analysis of the Aus0004 cells grown in TS-CAS8 media highlighted an important and significant decrease of four major muropeptides, which are essential intermediates of the PG biosynthesis (34). We showed here that the glycan strands, made up by *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and *N*-acetylmuramic acid (MurNAc) residues linked by β -1 \rightarrow 4 bonds were not impacted by the presence of CAS8 since the abundance decrease was not observed for every muropeptides entities. Thenceforth, we focused on the peptide stem bound to the D-lactoyl residue of MurNAc for which we demonstrated that abundance of all the tetrapeptide residues was impacted whatever the conformation of the peptide stem (see Fig. 5) with relative abundance decrease comprised between approximately 20% and 55% depending the type of muropeptides and the incubation time of the cells. This experiment confirmed that caspofungin have an important impact on PG composition since a significant decrease of 4 major muropeptides abundance appeared in the presence of the molecule, regardless the growth period (Fig 5). Since PG biosynthesis and furthermore PG composition seemed to be essential during the cell growth (34), the phenomenon observed here in the presence of caspofungin should provide clues concerning cells division reduction observed with the kinetic growth experiment and cell lysis (bactericidal effect) observed with the time-kill curves experiments. Moreover, this observation may be linked with the increase in vancomycin and daptomycin MICs.

Study of the effect of caspofungin on *E. faecium* Aus0004 using transcriptomic analysis by RNA-seq of. The strain *E. faecium* Aus0004 was also used to investigate transcriptomic changes in the presence of caspofungin. This strain genome contains a 2.9-Mb chromosome and three circular plasmids (20). The chromosome harbors 2,860 coding sequences (CDS) including several virulence factors previously described in multi-resistant *E. faecium* strains or a single copy of the well described Tn1549 containing the *vanB* operon conferring vancomycin resistance (35–37). We used a RNA-seq approach to understand the impact into pathway regulation generated by growth of Aus0004 in the presence or absence of subinhibitory concentration of caspofungin (-Cas or +Cas, respectively) determined at 8 mg/L (i.e. ¼ the MIC). Total RNA were isolated from the strain Aus0004 grown to the late-exponential phase, following rRNA depletion. A total of 21,367,260 and 31,769,367 reads were obtained for TS broth (-Cas) and TS broth with adjunction of 8 mg/L of caspofungin (+Cas) libraries, respectively, corresponding to an average genome coverage from 124X to 276X, respectively (Table S2). The reproducibility of duplicates was satisfactory (r^2 , >0.97) under both conditions (Fig S3).

Differences in genes expression in the presence of caspofungin. The expression of each annotated gene of Aus0004 in bacterial cells grown under -Cas and +Cas conditions is presented as a Circos Plot representation (Fig. 6A) (see also Table S3A in the supplemental material). To assess the reliability of RNA-seq in determining the relative abundance of individual transcripts in -Cas media and +Cas media, we used the identical total RNA samples and determined by reverse transcription-quantitative PCR (qRT-PCR) the mRNA levels of five upregulated genes (EFAU004_00822, *hupA*, *sodA*, *rpmG2*, EFAU004_02731) and six downregulated genes (*dexB*, *glpK*, *pdhD*, *pdhB*, EFAU004_01249, EFAU004_02122) (Table S4A). Those genes were chosen according to their levels of expression fold changes and their putative functions. The ratios of the transcripts from -Cas and +Cas samples

determined by RNA-seq and compared to those obtained by qRT-PCR resulted in an excellent concordance, with a Pearson correlation value of 0.9597 (Fig. 6B). Therefore, RNA-seq appeared to be a reliable method for global transcriptomic analysis in *E. faecium* under the conditions tested in this study.

The analysis of transcriptomic data obtained by RNA-seq highlighted 568 genes (approximately 20% of the genome) with statistically significantly modified transcription levels, with 245 genes showing a decrease and 323 genes an increase of at least 2-fold (*i.e.*, $\log_2 >1$ and *p-value* < 0,1) in mRNA amounts when cells grown in the presence of caspofungin compared to those grown in the absence of the antifungal agent, respectively (Tables S3B and S3C). All the genes presenting modified amounts of mRNA between the two conditions were classified into functional categories using the COG classification (38) (Fig. 7). Among these 568 genes, approximately 25% coded for proteins of unknown function or not found in other species avoiding gene ontology research. In the presence of caspofungin in the media, expression of genes encoding for proteins involved in carbohydrate transport or metabolism, energy production or conversion, nucleotide transport or metabolism was repressed whereas expression of gene coding for proteins involved in transcription, inorganic ion transport or metabolism, replication, recombination and repair, inorganic ion transport or metabolism and defense mechanisms was upregulated (Tables S3B and S3C).

Alteration of carbohydrate transport and metabolism by caspofungin. Out of the 10 genes most repressed by caspofungin assessed by the RNA-seq analysis, 6 were involved in carbohydrate transport or metabolism and especially several genes coding for phosphotransferase systems (PTS), which mediate sugar uptake in bacteria and use as energy source (Table S3B). Since it has been recently demonstrated that certain PTS genes acted as regulatory factors promoting adaption of *E. faecalis* to stressful conditions and potentially enhanced the possibility of bacterial survival (39), we could hypothesized that the severe

alteration of PTS transcripts rates played a role in the apparent lethality of *E. faecium* Aus0004 in the presence of caspofungin. Interestingly, several genes involved in glycerol metabolism in *E. faecium* showed a decrease of their transcripts levels. We observed a downregulation of the expression of genes composing the *glpKOF* operon (fold changes, - 6,2, - 5,1 and - 5,4, respectively) as well as genes composing the *dhaKLM* operon (fold changes, - 4,95, - 4,36 and -5,27, respectively) (Table S3B). It is well assumed now that glycerol is an essential precursor for the synthesis of lipids and in many Gram-positive bacteria, including enterococci, for the building of lipoteichoic acids (40). Moreover, it has been described in a previous review that glycerol metabolism pathways are under regulation of PTS system which transcripts levels are largely impacted here (41). There also was a strong repression of genes involved in the pyruvate metabolism since all the genes that composed the so-called *pdhABCD* operon coding for three enzymes, pyruvate dehydrogenase (E1), dihydrolipoyl acyltransferase (E2) and dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) (fold changes, - 4,3, - 9,7, - 7 and - 6,5, respectively). These enzymes allowed the pyruvate transformation in Acetyl-CoA then proceed by a two-step reduction to generate ATP, or directly enters into fatty acid biosynthesis (42). Since pyruvate dehydrogenation seemed to be impacted, we could hypothesize that in the presence of caspofungin, a lack of ATP is generated. This decrease of ATP formation may explain changes in bacterial fitness in the presence of caspofungin. All these data pointed out that caspofungin presence induced a stress state that modifies the carbohydrate metabolism and the cross-connected metabolic pathways essential for Aus0004 growth.

Impact of caspofungin on other important genes. When analyzing transcriptomic informations, it is important to note that we noted that among the 21 transcriptional regulators induced in the presence of caspofungin, the EFAU004_00252 gene presented an important upregulation (FC = 4,15) between the two experimental conditions. This gene coded for a

protein belonging to the IclR family, a group of transcriptional regulators whose products are involved in the glyoxylate shunt in *Enterobacteriaceae* or multidrug resistance (43) and its role in stress response induced by caspofungin will be further investigated. Interestingly, we observed cell wall modifications by SEM experiments and an increase of vancomycin or daptomycin MICs, suggesting a potential impact of caspofungin in the cell wall biosynthesis or in the *vanB* operon genes modulation. Unfortunately, these observations and hypothesis could not be explained or confirmed by transcriptomic analysis since no significant difference in expression between the two conditions was observed (fold change of *vanB* gene, - 2,2 with *p*-value > 0,1).

MATERIAL AND METHODS

Bacterial isolates and growth conditions. Bacterial strains used in this study are listed in Supplemental Table S1. The main strain used was the *vanB*-positive reference strain *E. faecium* Aus0004 of which the complete genome sequence is available (GenBank accession number CP003351.1) (20). For growth experiments, *E. faecium*, *S. aureus* and *E. faecalis* were cultured without shaking at 35°C in Trypticase-Soja (TS) broth whereas *E. coli*, *E. cloacae* and *P. aeruginosa* strains were cultured with shaking (200 rpm) at 35°C in TS medium. When required, especially for growth experiments, bacteria were cultured in TS broth with adjunction of non-antibiotic molecules mostly prescribed in ICUs as morphine (major analgesic), norepinephrine (vasoactive amine), pantoprazole (proton pump inhibitor), atracurium (neuromuscular blocking agent), paracetamol (minor analgesic), diazepam (benzodiazepine), unfractionated heparin (anticoagulant agent) and caspofungin (antifungal agent) (Candidas[®], MSD laboratories, Courbevoie, France) at a concentration corresponding to their awaiting circulating blood levels. In front of phenotypical impact of caspofungin, different growth experiments were made using a sub-inhibitory concentration corresponding

of 1/4 and 1/8 of the MIC found for *E. faecium* Aus0004. The same conditions were used for caspofungin acetate and micafungin experiments.

For biofilm formation experiments, *E. faecium* HM1070 Δ asrR was used as positive control as previously described (29).

Minimal Inhibition Concentration (MIC) determination. MICs of 5 different antifungal agents, e.g. micafungin, 5-fluorocytosine, voriconazole, amphotericin B and caspofungin were performed by the broth microdilution method (BMD) in Mueller-Hinton broth in three independent experiments. AST of *E. faecium* AUS0004 was performed according to the EUCAST recommendations and in presence of sub-inhibitory concentration of caspofungin corresponding to 8 mg.L⁻¹ in a MH agar medium. MICs of 4 antibiotics (vancomycin, teicoplanin, daptomycin and ciprofloxacin), and 4 antiseptics (benzalkonium chlorure, polyvidone, chlorhexidine and tetraphenylphosphonium chloride) were determined against *E. faecium* Aus0004 in the presence of 8 mg/L of caspofungin using Etest strips methods (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and BMD, respectively.

Biofilm formation assay in the presence of caspofungin. Capacity of two strains, e.g. AUS0004 and *E. faecium* HM1070 Δ asrR (a biofilm positive control mutant) (29) to form biofilm in presence of sub-inhibitory concentrations of caspofungin (2, 4 and 8 mg.L⁻¹) was evaluated at 24h. Briefly, bacteria that had been grown overnight were inoculated 1:100 in 10 ml of TS broth with 0.25% glucose and shared into 96-microwells polystyrene plates (NUNC, Denmark). After 24 h of static incubation at 35°C, the plates were washed three times with PBS and stained with 1% crystal violet for 30 min. The wells were rinsed with distilled water and ethanol-acetone (80:20, vol/vol). After drying, OD580 was determined using a microplate reader (Multiskan Ascent, Thermo Electron Corporation). Each assay was performed in

triplicate in at least three independent experiments and statistical comparison of means was performed using unpaired *t* test.

Time-kill curves experiments. Time–kill curves were determined for appreciate the exponential growth of *E. faecium* AUS0004 culture in an antibiotic concentration equal to 8× the MIC as previously described (44). Briefly, 16 hours overnight cultures were inoculated 1:20 in 10 ml of fresh MH broth containing anti-Gram positive antibiotics (vancomycin, linezolid, daptomycin) or caspofungin and incubated at 35°C for 24 hours. Bacterial survival was checked by CFU counts after 0, 3, 6, 9, and 24 h of incubation in three independent experiments by plating the cultures on BHI agar plates.

Cell-wall analysis by electronic microscopy. For SEM experiments, *E. faecium* Aus0004 cells were cultured in TS broth with adjunction of the eight most prescribed non antibiotic molecules at their awaiting serum concentrations except for caspofungin where a concentration of 8 mg.L⁻¹ (1/4 MIC) was used, during 7 hours and then pelleted by centrifugation, rinsed in PBS and fixed with 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer 0.1M [pH 7.0] at 4°C during 15h. The cells were rinsed in cacodylate buffer and then sedimented during 15 days on Thermanox® coverslip (Thermo Fischer Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) coated with poly-L-lysine, then dehydrated in progressive baths of ethanol (70-100%). Bacterial cells were sputtered with platinum and observed with scanning electron microscope JEOL 6400F (Jeol, Tokyo, Japan). For TEM experiments, the bacterial strain was cultured in the same conditions than SEM experiments, but after PBS rinse, the cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer 0.1M [pH 7.0] containing ruthenium red (0.4 mg/l) for 15h at 4°C. The cells were then rinsed and post-fixed 1 hour with 1% osmium tetroxyde in cacodylate buffer 0.1M [pH 7.0] in presence of ruthenium red (0.4 mg/l) at 4°C protected from light. The cells were rinsed, pelleted in 1.5% agar with a low melting point

(40°C) and then dehydrated in progressive ethanol baths (70-100%), embedded in resin Embed 812 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) and polymerised 24h at 60°C. Ultrathin sections were done and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The cells were observed with transmission electron microscope JEOL 1011 (Jeol, Tokyo, Japan) and images were taken with an ORIUS 200 CCD camera (Gatan France, Evry, France).

Determination of peptidoglycan composition and muropeptides analysis by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) coupled with MS/MS. For the peptidoglycan isolation, *E. faecium* Aus0004 cells were cultured in TS broth with and without caspofungin (8 mg.L⁻¹) during 6 hours (exponential phase), 7.5 hours (exponential – stationary phase) and 10 hours (stationary phase) and were then pelleted, resuspended in PBS and boiled while stirring in 10% SDS for 1 hour. Cell wall samples were then pelleted by ultracentrifugation at 65.000 rpm for 10 min and washed with Milli-Q water (Millipore Corporation, Billerica, Ma, USA) several times to remove the SDS. After resuspending the SDS-free pellets in cold Milli-Q water, walls were broken mechanically by adding to the suspension glass beads (diameter, 0.1 to 0.5 mm) and vortex them at 4°C at maximum speed for 15 min. Glass beads and the unbroken cells were sedimented leaving the sample at 4°C for 5 min without shaking. Then broken cells (supernatants) were recovered and transferred to a new tube. Vortex of the unbroken cells and glass beads was repeated by adding 1 ml of cold Milli-Q water to the sedimented pellets. After recovering again the soluble fraction the sample was ultracentrifuged (65.000 rpm, 10 min). The pellet was then resuspended in 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) and α -amylase (Sigma Aldrich, Saint Louis, MI, USA) digestion (100 mg/l final concentration) was carried out for 2 h at 37°C. Then MgSO₄ (20mM), DNase (10 mg/l) and RNase (50 mg/l) were added and samples were incubated for 2 h with shaking at 37°C. Afterwards, 10 mM CaCl₂ and 100 mg/l trypsin were added, and the sample was incubated for 18 h with stirring at 37°C. After addition of SDS to a final concentration of 1% (w/v),

reactions were heat-inactivated and detergent was removed by washing in Milli-Q water. The pellet was resuspended in 8 M LiCl and incubated at 37°C for 15 min. After harvesting, the pellet was suspended in 100 mM EDTA (pH 7.0). The pellet was then washed successively with water, acetone, and water. After the last step, the pellet was resuspended in water and the material obtained was dry by using a SpeedVac equipment (Eppendorf, Hamburg, Germany). Dried pellet was resuspended in ice-cold 48% hydrofluoric acid (HF) and stirred for 48 h at 4°C for removing teichoic acids. The sample was ultracentrifuged at 65.000 rpm, 15 min at 4°C and then washed twice with ice-cold water. Final pellet was resuspended in water and treated with 100 mg/l muramidase for 16 h at 37°C. Muramidase digestion was stopped by boiling and coagulated proteins were removed by 10 min centrifugation at 14,000 rpm. Supernatants were reduced by adding 0.5 M sodium borate pH 9.5 and sodium borohydride to a final concentration of 10 mg.ml⁻¹ and incubating for 30 min. Finally, samples were adjusted to pH 3.5 with phosphoric acid. Then, muropeptides composition was accessed by UPLC analysis using an ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm×150 mm (Waters, Milford, MA, USA) and detected at 204 nm. Muropeptides were separated using a linear gradient from buffer A (phosphate buffer 50 mM pH 4.35) to buffer B (phosphate buffer 50 mM [pH 4.95] methanol 15% (v/v)) in a 40 minutes run. Identity of the muropeptides was assigned by MS/MS spectrometry. Three independent experiments were carried out for each strain.

RNA isolation and transcriptomic analysis. *E. faecium* Aus0004 was cultured (for 7h at 35°C) to the late-exponential-growth phase on TS broth and in TS broth supplemented with sub-inhibitory concentration of caspofungin (8 mg/L) (annoted as +CAS media). Total RNA was extracted using the ZR Fungal/Bacterial RNA mini-prep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) in duplicate for each sample. Residual chromosomal DNA was removed by

treating samples with the TURBO DNA-free kit (Life Technologies, Saint-Aubin, France). DNA-free RNA samples were quantified using the NanoDrop One spectrophotometer (Thermo Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) and were then depleted from ribosomal RNAs (e.g. 23S, 16S, and 5S rRNAs) using the Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Gram-Positive Bacteria) (Illumina-Epicentre, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. Finally, the samples were washed using the RNA Clean and Concentrator – 5 kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). The rRNA depletion efficiency was evaluated by analysing the samples using the Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Les Ulis, France). cDNA libraries were prepared with the strand-specific NEXTFlex Rapid Directional RNA-Seq Kit (dUTP-based) v2, and sequencing was performed using an Illumina HiSeq 2500 instrument (Illumina, San Diego, CA, USA) with Run Rapid Single Read of 50 bp multiplexing protocol (ProfileXpert-LCMT, Lyon, France).

For the bioinformatic analysis, reads were mapped against sequence of *E. faecium* Aus0004 (GenBank accession numbers CP003351.1) using the CLC Genomics Workbench software v7.5 (CLCbio, Qiagen, San Diego, CA, USA). Fold change (FC) values, reads per kilobase per million mapped (RPKM) determination, and statistical analysis were performed using the CLC Genomics Workbench and DESeq R package as described [Anders Gene biology 2010]. Gene expressions were identified using a \log_2 absolute fold change and value greater than 1 were considered as induced or repressed, respectively, and statistical significance was accepted in case of a P value ≤ 0.1 . Mean expression and \log_2 FC values for each gene were plotted and visualized as a Circos figure. RPKM values of each gene were plotted and visualized using the Circos program as previously described (45). RNA-seq validation was accessed using qRT-PCR method over 10 unregulated genes (Table S4A and S4B). Total RNAs were extracted as described above and residual DNA was removed with the TURBO DNA-free kit. cDNA were synthesized from total RNA (approximately 1 μg) using the

QuantiFast reverse transcription kit (Qiagen, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions, and transcript levels were determined by the DeltaDelta Ct method using the *atpA* gene as a housekeeping control gene (Table S4A and S4B and Fig. 5B). Each experiment was performed in triplicate.

Accession number(s). Raw and processed data generated in this study have been submitted to the Gene Expression Omnibus (GEO) repository at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and are available under accession no. GSE100091.

ACKNOWLEDGEMENTS

The technical assistance of Michel Auzou, Brigitte Belin and Mamadou Godet was gratefully appreciated. This work was supported by a grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche to EA4655, Université de Caen Normandie, France.

All authors read and approved the manuscript, and declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. **Vincent J-L, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K, Investigators for the EIG of. 2009.** International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* **302**:2323–2329.
2. **Smythe MA, Melendy S, Jahns B, Dmuchowski C. 1993.** An exploratory analysis of medication utilization in a medical intensive care unit. *Crit Care Med* **21**:1319–1323.
3. **Maurice CF, Haiser HJ, Turnbaugh PJ. 2013.** Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. *Cell* **152**:39–50.
4. **Freestone PP, Hirst RA, Sandrini SM, Sharaff F, Fry H, Hyman S, O’Callaghan C. 2012.** *Pseudomonas aeruginosa*-catecholamine inotrope interactions: A contributory factor in the development of ventilator-associated pneumonia? *Chest J* **142**:1200–1210.
5. **Chen C, Brown DR, Xie Y, Green BT, Lyte M. 2003.** Catecholamines modulate *Escherichia coli* O157:H7 adherence to murine cecal mucosa. *Shock* **20**:183–188.
6. **Green BT, Lyte M, Chen C, Xie Y, Casey MA, Kulkarni-Narla A, Vulchanova L, Brown DR. 2004.** Adrenergic modulation of *Escherichia coli* O157:H7 adherence to the colonic mucosa. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* **287**:G1238–G1246.
7. **Dowd SE. 2007.** *Escherichia coli* O157:H7 gene expression in the presence of catecholamine norepinephrine. *Fems Microbiol Lett* **273**:214–223.
8. **Bansal T, Englert D, Lee J, Hegde M, Wood TK, Jayaraman A. 2007.** Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infect Immun* **75**:4597–4607.

9. **Karavolos M, Spencer H, Bulmer D, Thompson A, Winzer K, Williams P, Hinton J, Khan CA. 2008.** Adrenaline modulates the global transcriptional profile of *Salmonella* revealing a role in the antimicrobial peptide and oxidative stress resistance responses. *BMC Genomics* **9**:458.
10. **Lyte M, Freestone PPE, Neal CP, Olson BA, Haigh RD, Bayston R, Williams PH. 2003.** Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes. *Lancet* **361**:130–135.
11. **Cogan TA, Thomas AO, Rees LEN, Taylor AH, Jepson MA, Williams PH, Ketley J, Humphrey TJ. 2007.** Norepinephrine increases the pathogenic potential of *Campylobacter jejuni*. *Gut* **56**:1060–1065.
12. **Xu F, Wu C, Guo F, Cui G, Zeng X, Yang B, Lin J. 2015.** Transcriptomic analysis of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 in response to epinephrine and norepinephrine. *Front Microbiol* **6**.
13. **Babrowski T, Holbrook C, Moss J, Gottlieb L, Valuckaite V, Zaborin A, Poroyko V, Liu DC, Zaborina O, Alverdy JC. 2012.** *Pseudomonas aeruginosa* virulence expression is directly activated by morphine and is capable of causing lethal gut derived sepsis in mice during chronic morphine administration. *Ann Surg* **255**:386–393.
14. **Peterson G, Kumar A, Gart E, Narayanan S. 2011.** Catecholamines increase conjugative gene transfer between enteric bacteria. *Microb Pathog* **51**:1–8.
15. **Rice LB, Carias LL, Rudin S, Hutton R, Marshall S, Hassan M, Josseume N, Dubost L, Marie A, Arthur M. 2009.** Role of class A Penicillin-Binding Proteins in the expression of β -lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol* **191**:3649–3656.

16. **Arias CA, Murray BE. 2012.** The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* **10**:266–278.
17. **Cattoir V, Leclercq R. 2013.** Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *J Antimicrob Chemother* **68**:731–742.
18. **Lebreton F, Schaik W van, McGuire AM, Godfrey P, Griggs A, Mazumdar V, Corander J, Cheng L, Saif S, Young S, Zeng Q, Wortman J, Birren B, Willems RJL, Earl AM, Gilmore MS. 2013.** Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. *Mbio* **4**.
19. **Cattoir V, Giard J-C. 2014.** Antibiotic resistance in *Enterococcus faecium* clinical isolates. *Expert Rev Anti Infect Ther* **12**:239–248.
20. **Lam MMC, Seemann T, Bulach DM, Gladman SL, Chen H, Haring V, Moore RJ, Ballard S, Grayson ML, Johnson PDR, Howden BP, Stinear TP. 2012.** Comparative analysis of the first complete *Enterococcus faecium* genome. *J Bacteriol* **194**:2334–2341.
21. **Lyte M. 2004.** Microbial endocrinology and infectious disease in the 21st century. *Trends Microbiol* **12**:14–20.
22. **Freestone PP, Haigh RD, Lyte M. 2007.** Blockade of catecholamine-induced growth by adrenergic and dopaminergic receptor antagonists in *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica*. *BMC Microbiol* **7**:8.
23. **Siala W, Kucharíková S, Braem A, Vleugels J, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq M-P, Van Dijck P, Van Bambeke F. 2016.** The antifungal caspofungin increases fluoroquinolone activity against *Staphylococcus aureus* biofilms by inhibiting N-acetylglucosamine transferase. *Nat Commun* **7**.

24. **Loiko V, Wagener J. 2017.** The paradoxical effect of echinocandins in *Aspergillus fumigatus* relies on recovery of the β -1,3-glucan synthase Fks1. *Antimicrob Agents Chemother* **61**:e01690–16.
25. **Walker LA, Gow NAR, Munro CA. 2010.** Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol* **47**:117–126.
26. **Hall GS, Myles C, Pratt KJ, Washington JA. 1988.** Cilofungin (LY121019), an antifungal agent with specific activity against *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **32**:1331–1335.
27. **Szybalski W, Bryson V. 1952.** Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of *Escherichia coli* to fifteen antibiotics. *J Bacteriol* **64**:489–499.
28. **Bachmann SP, VandeWalle K, Ramage G, Patterson TF, Wickes BL, Graybill JR, López-Ribot JL. 2002.** In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3591–3596.
29. **Lebreton F, van Schaik W, Sanguinetti M, Posteraro B, Torelli R, Le Bras F, Verneuil N, Zhang X, Giard J-C, Dhalluin A, Willems RJL, Leclercq R, Cattoir V. 2012.** AsrR is an oxidative stress sensing regulator modulating *Enterococcus faecium* opportunistic traits, antimicrobial resistance, and pathogenicity. *Plos Pathog* **8**.
30. **Machka K, Braveny I. 1987.** Comparative in vitro activity of LY146032 (daptomycin) against gram-positive cocci. *Eur J Clin Microbiol* **6**:96–99.
31. **Rybak MJ, Cappelletty DM, Moldovan T, Aeschlimann JR, Kaatz GW. 1998.** Comparative in vitro activities and postantibiotic effects of the oxazolidinone

compounds eperezolid (PNU-100592) and linezolid (PNU-100766) versus vancomycin against *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother **42**:721–724.

- 32. Bingen E, Lambert-Zechovsky N, Leclercq R, Doit C, Mariani-Kurkdjian P. 1990.** Bactericidal activity of vancomycin, daptomycin, ampicillin and aminoglycosides against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. J Antimicrob Chemother **26**:619–626.
- 33. Akins RL, Rybak MJ. 2001.** Bactericidal activities of two daptomycin regimens against clinical strains of glycopeptide intermediate-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in an in vitro pharmacodynamic model with simulated endocardial vegetations. Antimicrob Agents Chemother **45**:454–459.
- 34. Vollmer W, Blanot D, Pedro D, A M. 2008.** Peptidoglycan structure and architecture. FEMS Microbiol Rev **32**:149–167.
- 35. Garnier F, Taourit S, Glaser P, Courvalin P, Galimand M. 2000.** Characterization of transposon Tn1549, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp. Microbiology **146**:1481–1489.
- 36. Nallapareddy SR, Weinstock GM, Murray BE. 2003.** Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acn, a new member of the MSCRAMM family. Mol Microbiol **47**:1733–1747.
- 37. Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. 1999.** Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. Infect Immun **67**:193–200.

38. **Tatusov RL, Koonin EV, Lipman DJ. 1997.** A genomic perspective on protein families. *Science* **278**:631–637.
39. **Peng Z, Ehrmann MA, Waldhuber A, Niemeyer C, Miethke T, Frick J-S, Xiong T, Vogel RF. 2017.** Phosphotransferase systems in *Enterococcus faecalis* OG1RF enhance anti-stress capacity in vitro and in vivo. *Res Microbiol in press*
40. **Coyette J, Hancock LE. 2014.** Enterococcal cell wall, p. 177–218. *In* From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Gilmore & al.
41. **Deutscher J, Francke C, Postma PW. 2006.** How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**:939–1031.
42. **Ramsey M, Hartke A, Huycke MM. 2012.** The Physiology and metabolism of enterococci, p. 581–635. *In* Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Gilmore & al.
43. **Molina-Henares AJ, Krell T, Eugenia Guazzaroni M, Segura A, Ramos JL. 2006.** Members of the IclR family of bacterial transcriptional regulators function as activators and/or repressors. *FEMS Microbiol Rev* **30**:157–186.
44. **Moellering RC, Wennersten C, Weinberg AN. 1971.** Studies on antibiotic synergism against enterococci. I. Bacteriologic studies. *J Lab Clin Med* **77**:821–828.
45. **Krzywinski M, Schein J, Birol Í, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, Jones SJ, Marra MA. 2009.** Circos: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res* **19**:1639–1645.

LEGENDS

Figure 1. **A)** *E. faecium* Aus0004 growth during 24 hours in neutral Trypticase-Soja broth and with adjunction of 8 non-antibiotic molecules commonly used in ICUs at their awaiting clinical concentrations (except for caspofungin used as 8 mg/L equivalent at $\frac{1}{4}$ MIC, CAS8). **B)** *E. faecium* Aus0004 growth in TS broth additioning of caspofungin (CAS8) and an other echinocandin, Micafungin at a concentration of $\frac{1}{4}$ MIC (MIC16). **C)** Growth curves of *E. faecium* Aus0004, *Enterococcus faecalis* ATCC29212 and *Staphylococcus aureus* ATCC29213 in the presence of sub-inhibitory concentration of caspofungin (8 mg/L). **D)** Growth in Luria-Bertani broth with adjunction of caspofungin (8 mg/L) of *Escherichia coli* ATCC25922, *Enterobacter cloacae* ATCC13047 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853.

Figure 2. Biofilm formation assay in the presence of increasing concentrations of caspofungin in *E. faecium* Aus0004 strain (a weak biofilm producer) and *E. faecium* HM1070 Δ asrR (a positive biofilm former strain). Statistical comparison between caspofungin concentrations impact was performed using the unpaired *t* test. Asterisks represent significant *P* value from comparisons as described on the graphic of *** < 0,0005 and **** < 0,0001.

Figure 3. Time-kill curves of different anti-Gram-positive antibiotics and caspofungin against *E. faecium* Aus0004 ($8 \times$ MIC) in TS broth.

Figure 4. Cell wall analysis of *E. faecium* Aus0004 in the presence of caspofungin by electronic microscopy **A)** Scanning electron microscopy images of *E. faecium* Aus0004 cells grown in TS broth (left) or TS broth + caspofungin (right). Magnification $\times 20,000$. **B)** Transmission electron microscopy images of *E. faecium* Aus0004 cells growth in TS broth (left) or TS broth + caspofungin (right). Magnification $\times 80,000$.

Figure 5. Muropeptide abundance deduce by mass spectrometry analysis after bacterial growth in TS broth with and without caspofungin adjunction (8 mg/L) and different time of growth. Exponential phase = 6 hours, Exponential-stationary phase = 7,5 hours and stationary phase = 10 hours.

Figure 6. Transcriptional response of *E. faecium* Aus0004 grown with caspofungin **A)** Global analysis of transcript levels in *E. faecium* Aus0004 by RNA-seq. Conditions –Cas and +Cas refer to bacterial growth in the absence or presence of caspofungin (8 mg/L), respectively. Blue and green circles correspond to the mean expression of each gene (as calculated by differential expression sequencing [DESeq] in bacteria grown under –Cas and +Cas conditions, respectively. The red line in the gray circle represents the baseline, and the thin gray circular lines represent 2 fold-changes (or $\log_2 = 1$) in expression of each gene (see Table S3A). Outermost circle represents the full *E. faecium* Aus0004 genome with a $\times 50$ magnification of the genes for which the expression was confirmed by qRT-PCR. **B)** Validation of RNA-seq results by qRT-PCR of 11 genes. Mean \log_2 ratios of values determined in the qRT-PCR experiments are plotted against the mean \log_2 ratios of the RNA-seq experiments.

Figure 7. Classification in functional categories of 568 *E. faecium* Aus0004 genes significantly induced (n = 323) or repressed (n = 245) in the presence of caspofungin, according to the KEGG pathways available at www.kegg.jp.

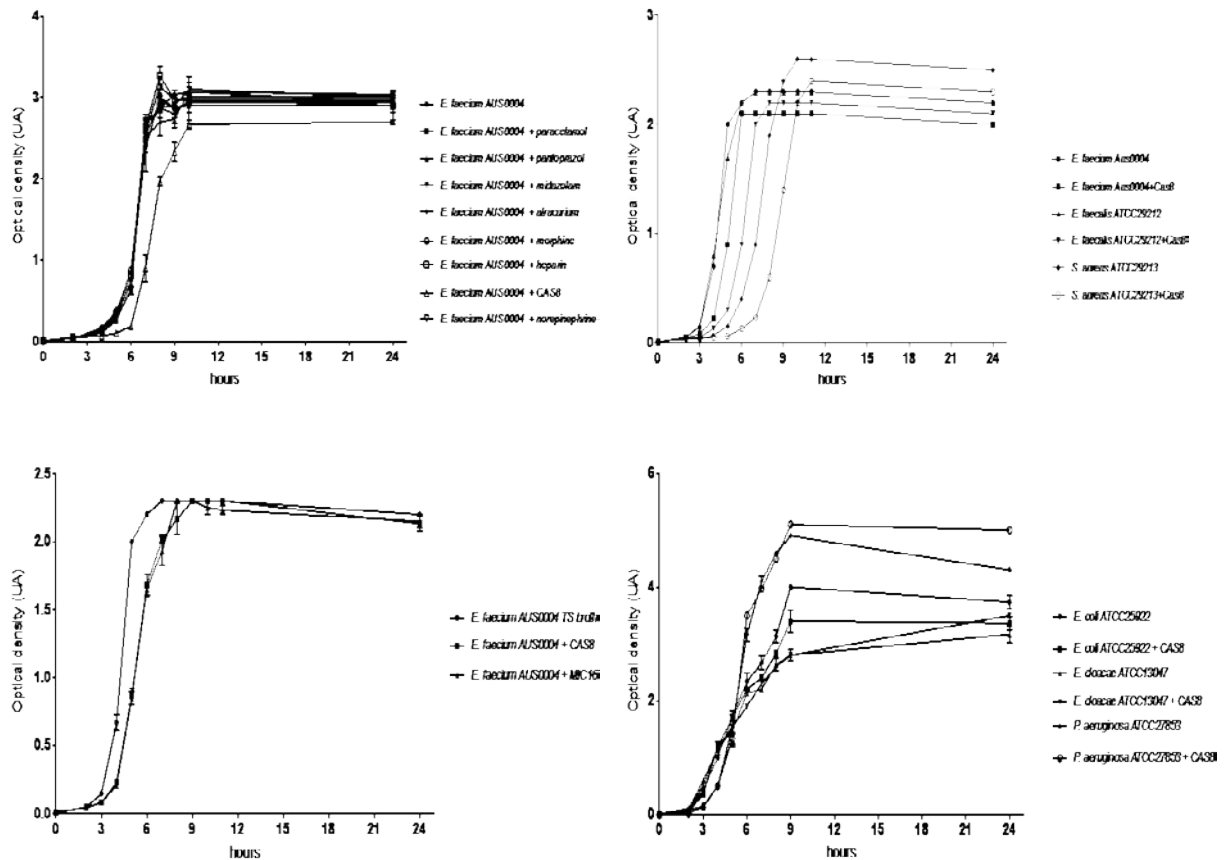


Figure 1. A) *E. faecium* AUS0004 growth during 24 hours in neutral Trypticase-Soja broth and with adjunction of 8 *non antibiotic* molecules commonly used in Intensive Care Unit at their awaiting clinical concentrations (except for caspofungin used as 8 mg.L⁻¹ equivalent at ¼ MIC, CAS8). B) *E. faecium* AUS0004 growth in TS broth additioning of caspofungin (CAS8) and an other echinocandin, Micafungin at a concentration of ¼ MIC (MIC16). C) Growth curves of *E. faecium* AUS0004, *Enterococcus faecalis* ATCC29212 and *Staphylococcus aureus* ATCC29213 in presence of sub-inhibitory concentration of caspofungin. D) Growth in Luria-Bertani broth with adjunction of caspofungin (8 mg.L⁻¹) of *Escherichia coli* ATCC25922, *Enterobacter cloacae* ATCC13047 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853.

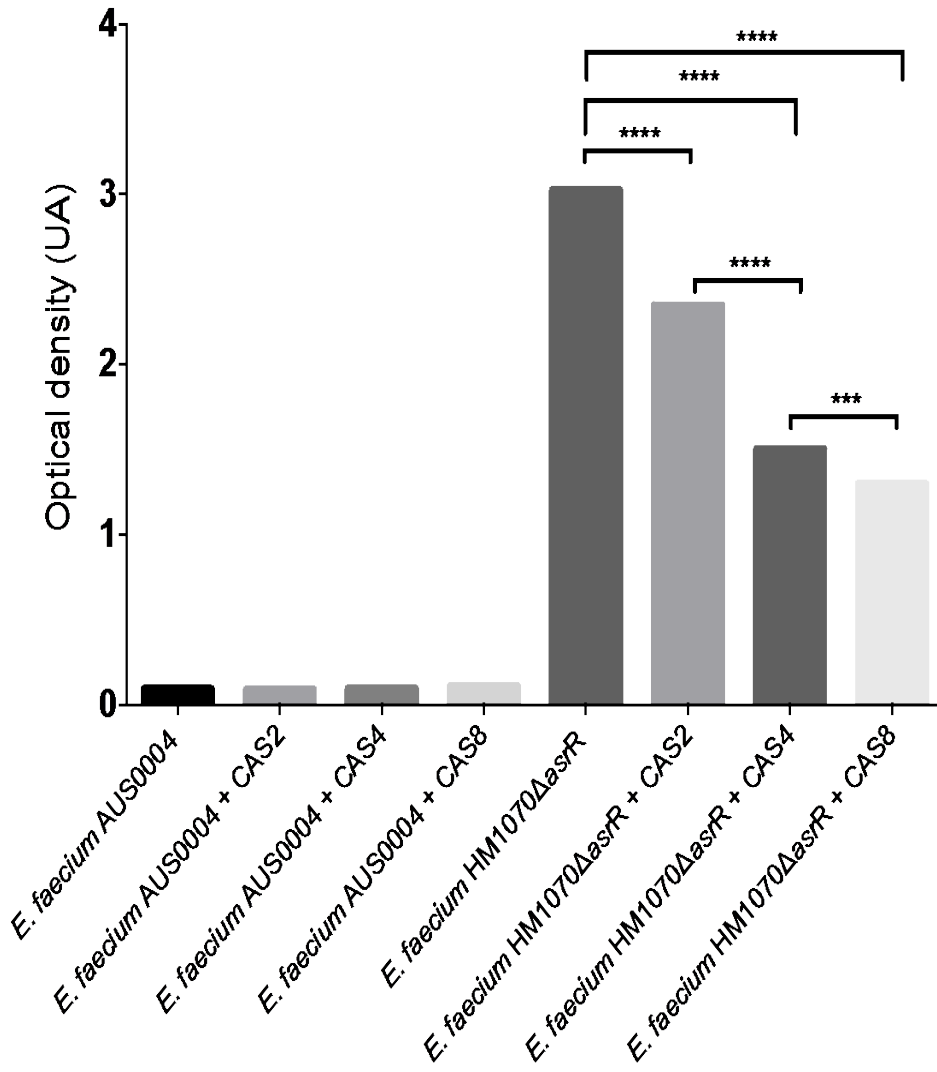


Figure 2. Biofilm formation assay in presence of increasing concentration of caspofungin in *E. faecium* AUS0004 strain (a weak biofilm producer) and *E. faecium* HM1070ΔasrR (a positive biofilm former strain).

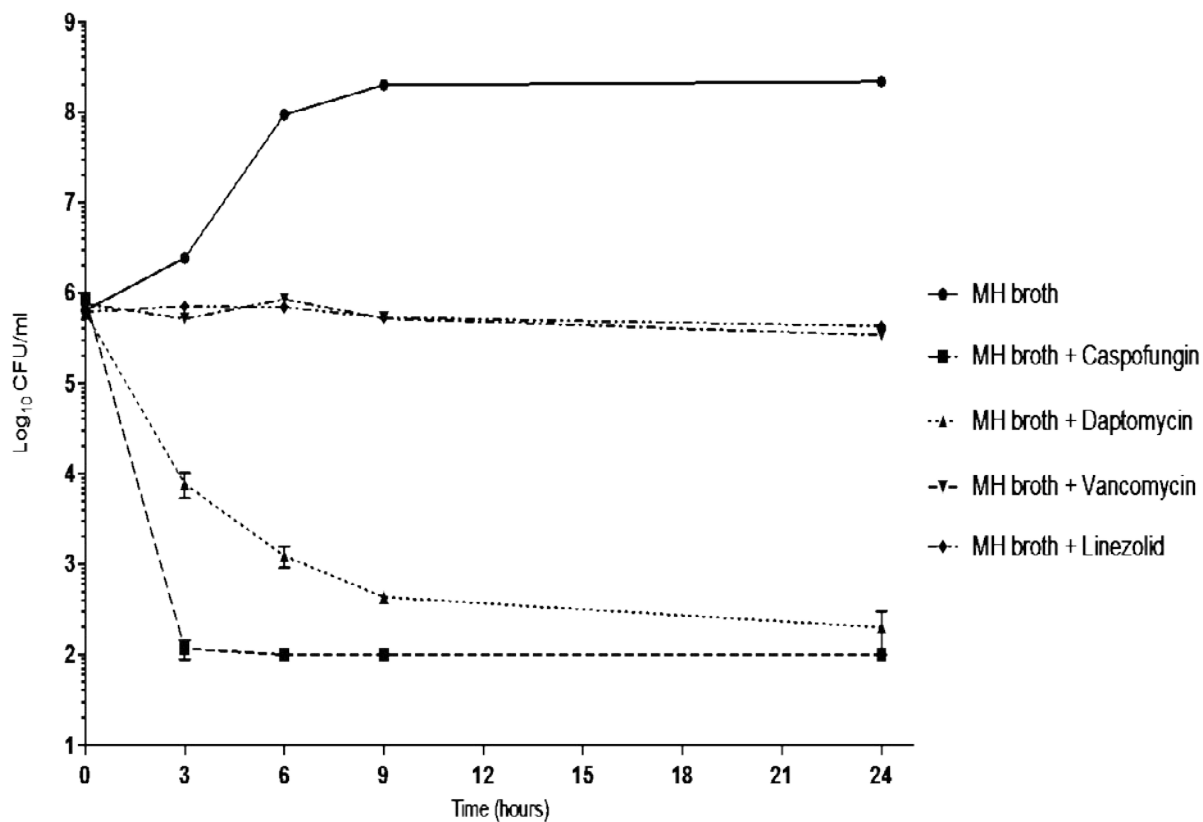
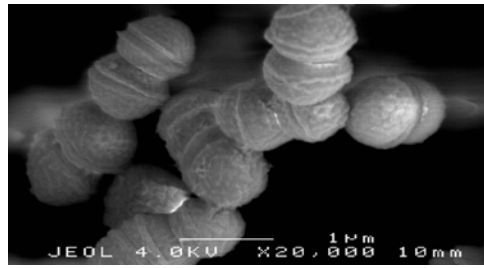
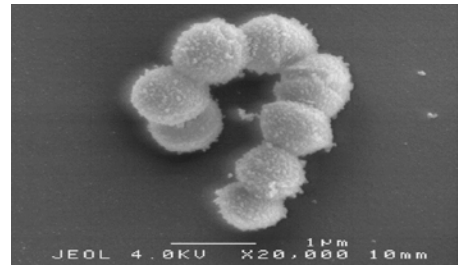


Figure 3. Time-kill curves of different anti-Gram positive antibiotics and caspofungin against *E. faecium* AUS0004 (MIC x8) in TS broth.

A)

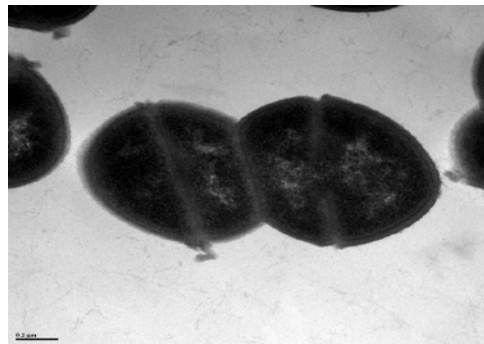


TS Broth

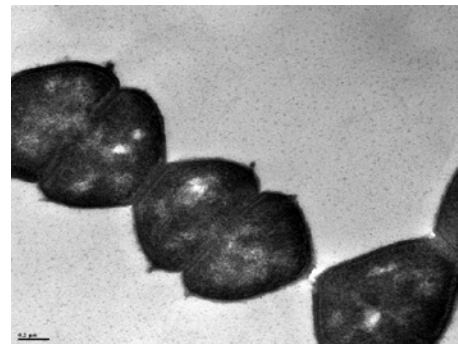


TSB + CAS (8 mg/L)

B)



TS Broth



TSB + CAS (8 mg/L)

Figure 4. Cell wall analysis of *E. faecium* AUS0004 in presence of caspofungin by electronic microscopy **A)** Scanning electron microscopy images of *E. faecium* AUS0004 **B)** Transmission electron microscopy images of *E. faecium* AUS0004

Quantification of the relative abundance of each muropeptide:

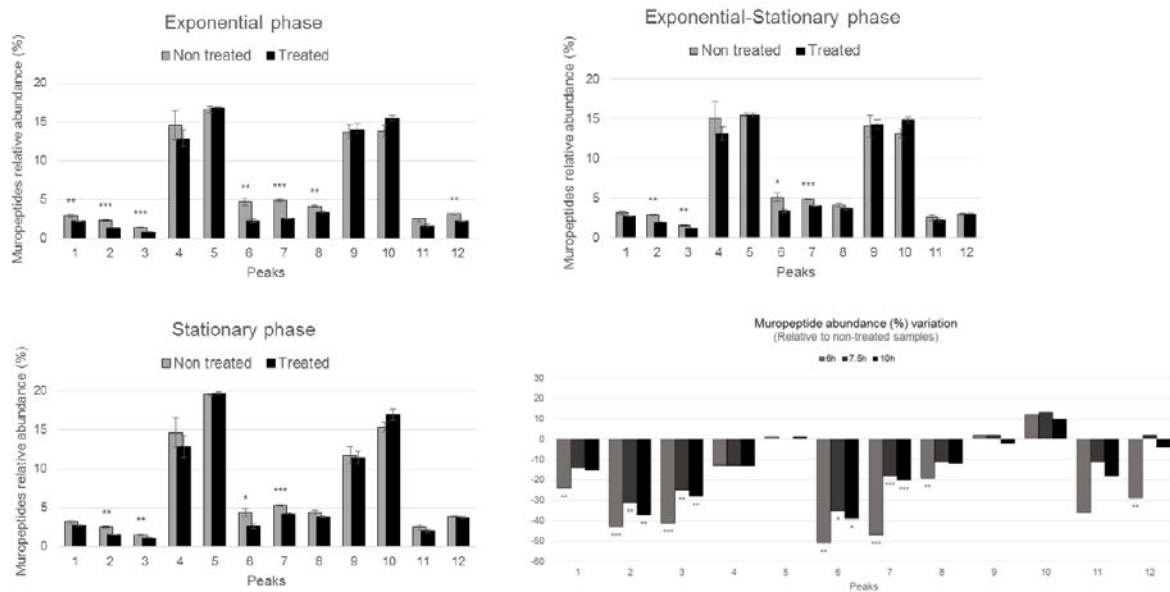


Figure 5. Muropeptide abundance deduce by mass spectrometry analysis after bacterial growth in TS broth with and without caspofungin adjunction and different time of growth.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

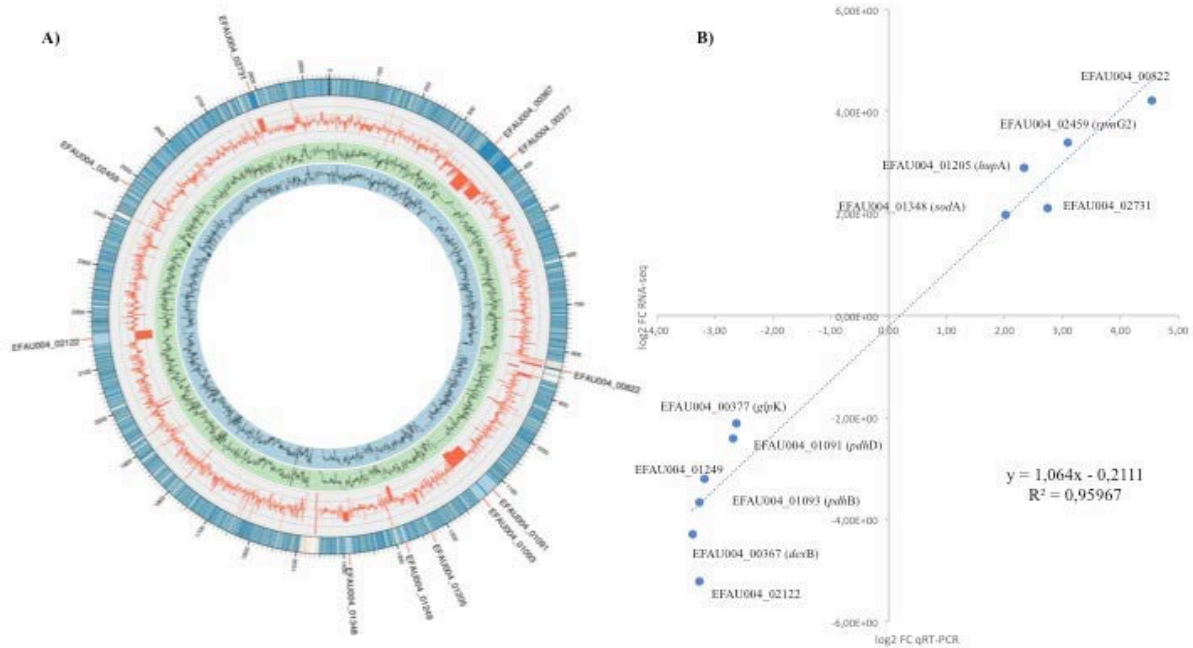


Figure 6. Transcriptional response of *E. faecium* AUS0004 growth with caspofungin A) Global analysis of transcript levels in *E. faecium* AUS0004 by RNA-seq. B) Validation of RNA-seq results by qRT-PCR of 11 genes.

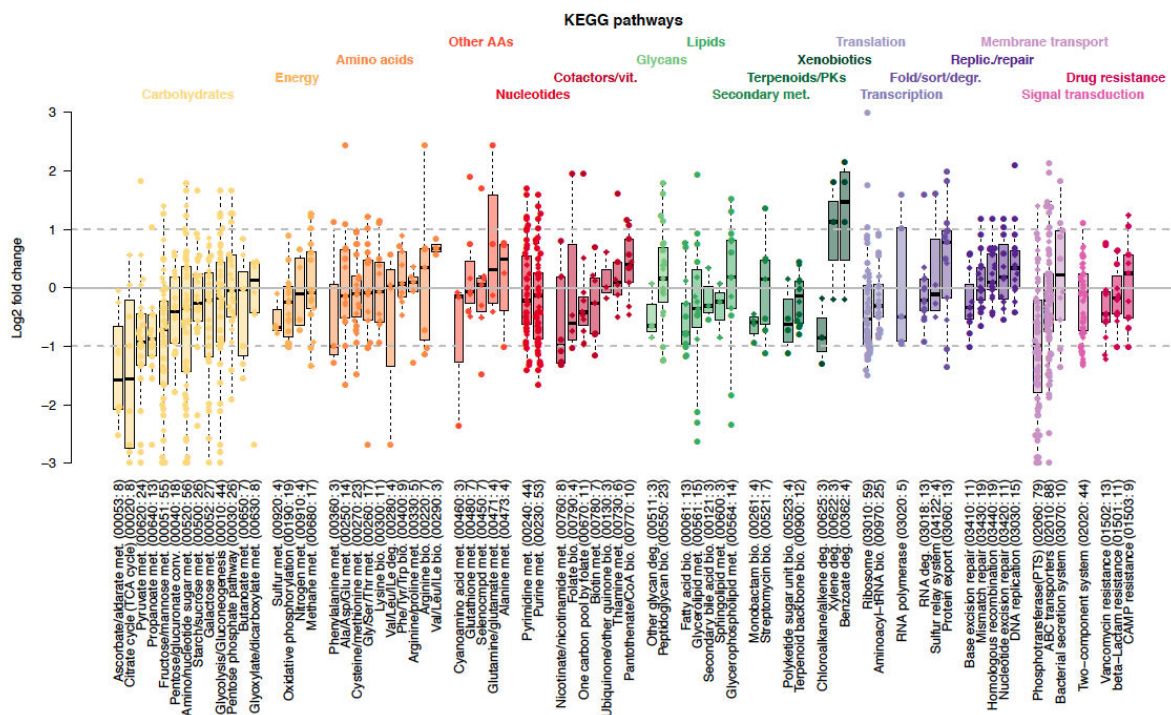


Figure 7. Classification in functional categories of 568 *E. faecium* AUS0004 genes significantly induced (n = 323) or repressed (n = 245) by growth in presence of caspofungin, according to the KEGG pathways available in www.kegg.jp.

Table 1. Antimicrobial susceptibility testing of *E. faecium* strains harboring different type of *van* operon.

Bacterial strains	<i>van</i> operon	MICs (mg/L)							
		Vancomycin		Teicoplanin		Daptomycin		Ciprofloxacin	
<i>Enterococcus faecium</i>		MH	CAS8	MH	CAS8	MH	CAS8	MH	CAS8
UCN103	<i>vanA</i>	24	256	4	4	-	-	-	-
UCN104	<i>vanA</i>	24	256	2	2	-	-	-	-
UCN105	<i>vanA</i>	4	24	2	2	-	-	-	-
Aus0004	<i>vanB</i>	4	24	0.5	1	2	8	0.75	1.5
UCN 106	<i>vanB</i>	12	48	0.75	0.75	-	-	-	-
UCN 107	<i>vanB</i>	12	64	0.38	0.5	-	-	-	-
UCN 108	<i>vanB</i>	24	64	0.38	0.5	-	-	-	-
UCN 109	<i>vanB</i>	48	256	0.25	0.5	-	-	-	-
UCN 110	-	0.38	1	-	-	1.5	3	-	-
UCN 111	-	0.38	1	-	-	2	4	-	-
UCN 112	-	0.75	1						
UCN 113	-	0.5	0.75						
UCN 114	-	0,38	0,75			1	3	-	-

^aMH : Mueller-Hinton ; ^bCAS8 : Mueller-Hinton + Caspofungin (8 mg/L)

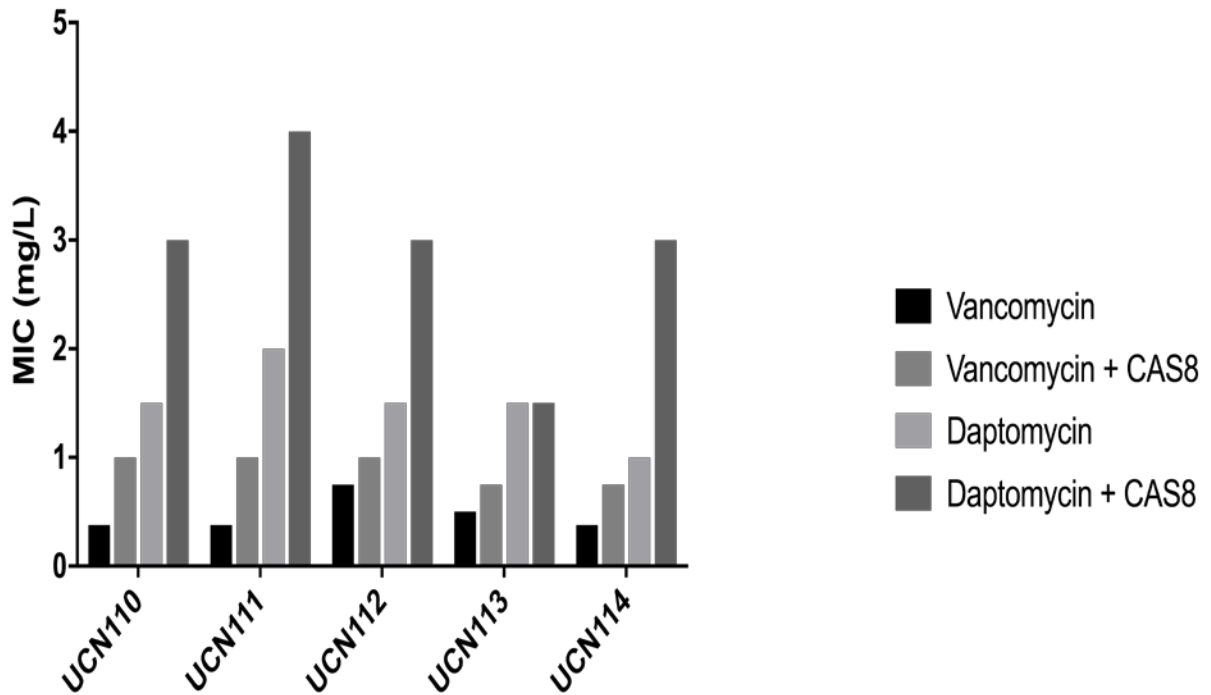


Figure S1. Antimicrobial susceptibility testing of 5 vancomycin-susceptible strains of *E. faecium* against vancomycin (black bars), vancomycin + caspofungin 8 mg/L (CAS8, gray bars), daptomycin (light gray bars) and daptomycin + caspofungin 8 mg/L (CAS8, dark gray bars).

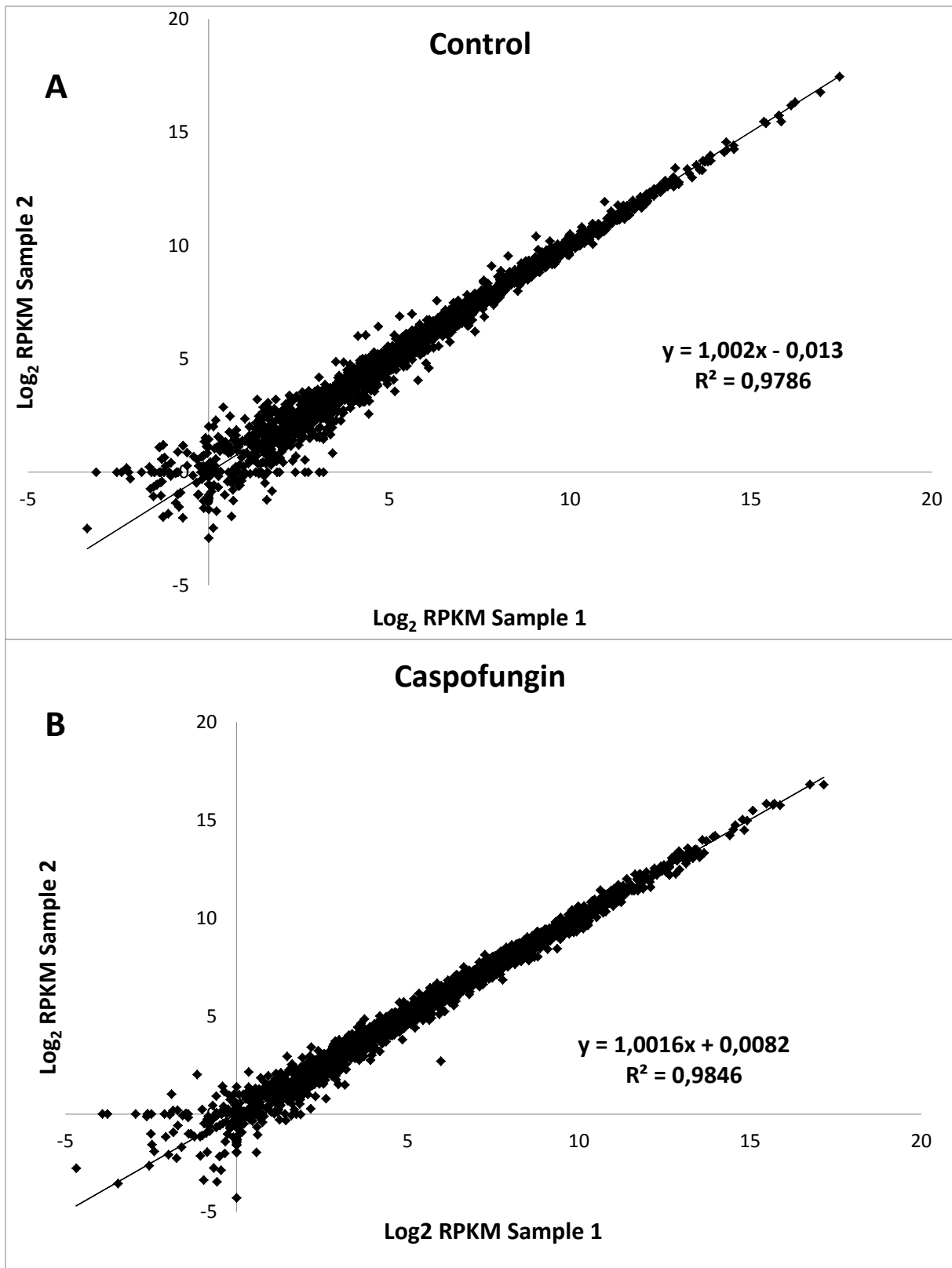


Figure S2. RNA-seq analysis reproducibility for samples grown with and without caspofungin.

Table S1. Bacterial strains used in this study

Strains	Relevant characteristics and antibiotic resistances ^a	Source
<i>Enterococcus faecium</i>		
Aus0004	<i>vanB</i> -positive reference strain, Van	[Lam & al.]
HM1070	Clinical strain, Rif, Fus	[Bozdogan 1999]
HM1070 Δ <i>asrR</i>	HM1070 derivative with an in-frame deletion of <i>asrR</i>	[Lebreton 2012]
UCN103	Clinical strain harboring the <i>vanA</i> operon, Van, Tei	This study
UCN104	Clinical strain harboring the <i>vanA</i> operon, Van, Tei	This study
UCN105	Clinical strain harboring the <i>vanA</i> operon, Van, Tei	This study
UCN106	Clinical strain harboring the <i>vanB</i> operon, Van	This study
UCN107	Clinical strain harboring the <i>vanB</i> operon, Van	This study
UCN108	Clinical strain harboring the <i>vanB</i> operon, Van	This study
UCN109	Clinical strain harboring the <i>vanB</i> operon, Van	This study
UCN110	Clinical-susceptible strain	This study
UCN111	Clinical-susceptible strain	This study
UCN112	Clinical-susceptible strain	This study
UCN113	Clinical-susceptible strain	This study
UCN114	Clinical-susceptible strain	This study
<i>Enterococcus faecalis</i>		
ATCC29212	Wild-type reference strain ATCC29212 used as control	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>		
ATCC29213	Wild-type reference strain ATCC29213 used as control	ATCC
<i>Escherichia coli</i>		
ATCC25922	Wild-type reference strain ATCC25922 used as control	ATCC
<i>Enterobacter cloacae</i>		
ATCC13147	Wild-type reference strain ATCC13147 used as control	ATCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
ATCC27853	Wild-type reference strain ATCC27853 used as control	ATCC

^a Rif, Rifampicin; Fus, Fusidic acid; Van, Vancomycin; Tei, Teicoplanin

Table S2. Summary of RNA-seq coverage data

Parameter	-Cas		+Cas	
	Sample 1	Sample 2	Sample 1	Sample 2
Total number of reads	14,042,730	7,324,530	15,434,244	16,335,123
Number of mapped reads	11,392,303	1,268,003	11,557,154	5,799,262
Percentage of mapped reads (%)	81	17	75	35
Average size of mapped reads (nt)	50	50	50	50
Average coverage of the genome (X) ^a	237	124	261	276
Number of reads mapped to rRNA genes	24,240	40,535	5,435	1,731
Percentage of reads mapped to rRNA genes (%)	0,41	0,68	0,09	0,03
Number of reads mapped to CDSs	2,865,204	2,983,982	3,758,303	3,783,367
Percentage of reads mapped to CDSs (%)	48	50	63	63
Average number of reads per CDS ^b	1002	1043	1314	1323

^a The chromosome size of *E. faecium* Aus0004 is 2,955,294 bp.

^b The number of predicted chromosomal CDSs is 2,860.

Table S38. Genes whose transcript levels have increased during growth with caspofungin (8 mg/L) compared to control condition (no antifungal agent)

Gene ID	Product	COG code	COG functional category	Start	End	baseMean	baseMeanA	baseMeanB	foldChange	log2FoldChange	pval	padj
EFAU004_00466	diaminopimelate decarboxylase	E	Amino acid transport and metabolism	481628	482888	115.11	72.75	157.45	2.16	1.11	0.00158406	0.004510365
EFAU004_00538	P-uridine cytidine desulfurase	E	Amino acid transport and metabolism	557103	558240	475.25	235.58	714.82	3.03	1.60	3.36E-13	7.17E-12
EFAU004_00857	amino acid permease family protein	E	Amino acid transport and metabolism	866447	867875	1447.24	380.66	2513.83	6.60	2.72	5.77E-14	1.39E-12
EFAU004_00858	glutaminase	E	Amino acid transport and metabolism	867897	868824	7059.12	2209.51	11908.72	5.39	2.43	6.79E-29	1.03E-26
EFAU004_01190	GDH-like lipase/acylhydrolase	E	Amino acid transport and metabolism	1218095	1218952	1819.56	677.50	3046.53	4.53	2.18	3.57E-29	4.37E-27
EFAU004_01564	hypothetical protein	E	Amino acid transport and metabolism	1988380	1989564	543.98	340.83	747.13	2.19	1.13	0.006692554	0.020772329
EFAU004_02214	Aminopeptidase C	E	Amino acid transport and metabolism	2241600	2242929	855.18	513.50	1196.85	2.33	1.22	2.74E-08	1.64E-07
EFAU004_02612	oligopeptidase, Pept1/MB family	E	Amino acid transport and metabolism	2671324	2673124	2942.77	1837.80	4027.74	2.17	1.12	5.00E-10	6.47E-09
EFAU004_00729	MAI glutaryl aminopeptidase	EG	Amino acid transport and metabolism; Carbohydrate transport and metabolism	762679	763762	680.25	376.63	981.87	2.59	1.37	7.30E-12	1.25E-10
EFAU004_00087	phosphoglycerate mutase 1	G	Carbohydrate transport and metabolism	89857	90744	5355.81	3716.01	7495.61	2.33	1.22	1.37E-09	1.65E-08
EFAU004_00545	major facilitator superfamily transporter	G	Carbohydrate transport and metabolism	565336	566691	215.80	132.72	294.89	2.16	1.11	3.27E-05	0.000174118
EFAU004_00695	fructose-bisphosphate aldolase	G	Carbohydrate transport and metabolism	718417	729287	28204.63	16389.66	39659.60	2.42	1.27	4.77E-13	9.85E-12
EFAU004_01089	neopterin monophosphatase family protein	G	Carbohydrate transport and metabolism	1112489	1113248	611.38	344.56	878.20	2.55	1.35	1.32E-07	1.07E-06
EFAU004_01712	D-xylose 5-phosphate/D-fructose 6-phosphate phosphoketolase	G	Carbohydrate transport and metabolism	1735432	1736317	703.75	445.43	974.07	2.10	1.13	6.96E-08	6.54E-07
EFAU004_01713	D-xylose 5-phosphate/D-fructose 6-phosphate phosphoketolase	G	Carbohydrate transport and metabolism	1736310	1737955	905.35	532.82	1277.88	2.40	1.26	3.09E-10	4.15E-09
EFAU004_01783	Glucose-6-phosphate isomerase	G	Carbohydrate transport and metabolism	1800204	1807371	98899.45	18858.58	90040.31	3.15	1.66	9.84E-21	5.51E-19
EFAU004_01808	major facilitator superfamily transporter	G	Carbohydrate transport and metabolism	1831671	1832865	21.23	12.56	29.86	2.37	1.25	0.048931316	0.095544389
EFAU004_01962	kinase, PfkA family	G	Carbohydrate transport and metabolism	1986155	1987181	453.46	267.61	639.30	2.39	1.26	2.99E-07	2.19E-06
EFAU004_02179	glycosyl hydrolase, family 88	G	Carbohydrate transport and metabolism	2200862	2202065	65.48	41.83	80.12	2.13	1.09	0.015380276	0.045564321
EFAU004_02765	methylglyoxal synthase	G	Carbohydrate transport and metabolism	2299268	2299551	353.77	232.07	475.47	2.05	1.03	8.10E-06	4.73E-05
EFAU004_02470	phosphoglycerate mutase family protein	G	Carbohydrate transport and metabolism	2487642	2488902	381.18	251.51	511.05	2.03	1.02	6.19E-06	3.70E-05
EFAU004_02543	ABC transporter permease	G	Carbohydrate transport and metabolism	2572283	2573156	71.56	41.65	101.47	2.04	1.28	0.001739215	0.012361493
EFAU004_02804	ABC transporter, ATP binding protein	G	Carbohydrate transport and metabolism	2871692	2873108	79.10	51.83	106.55	2.06	1.04	0.008191212	0.033936861
EFAU004_00051	FtsK/SpoII family protein	D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	52795	54000	101.81	52.94	150.68	2.05	1.51	7.40E-05	0.000364807
EFAU004_00775	cell division protein DivIVA	D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	806749	807457	4276.38	2741.20	5710.67	2.08	1.06	3.57E-09	3.95E-08
EFAU004_00994	cell division protein DivIVA	D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	1015402	1015822	3066.22	1568.23	4564.21	2.01	1.04	3.37E-17	1.16E-15
EFAU004_02110	cell division protein ZapA	D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	2138308	2138746	468.10	268.08	668.32	2.09	1.32	2.50E-09	2.89E-08
EFAU004_02445	hypothetical protein	D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	2712127	2713012	7036.46	4566.42	9506.50	2.08	1.06	4.34E-09	4.77E-08
EFAU004_00775	glycosyl transferase, group 7 family protein	N	Cell motility	274019	274967	3549.09	1636.26	5463.69	3.34	1.74	1.55E-19	7.46E-18
EFAU004_02818	bacterial Peptidase A24 protein	NU	Cell motility, intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	2885018	2885705	32.75	23.64	44.87	2.17	1.12	0.033128211	0.09957947
EFAU004_00412	uracilase family protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	421411	423583	507.08	287.89	846.27	2.04	1.06	4.38E-13	9.20E-12
EFAU004_00598	uracilase family protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	614435	615149	1504.22	935.18	2092.95	2.29	1.19	6.80E-10	8.61E-09
EFAU004_00696	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	719451	730723	388.13	202.08	474.18	2.05	1.23	3.57E-06	2.25E-05
EFAU004_01209	LysM domain containing protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	1233717	1236353	3376.33	1777.06	4801.61	2.05	1.06	6.68E-08	4.73E-07
EFAU004_01566	hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	1581652	1582324	317.38	195.13	439.62	2.25	1.17	6.48E-07	4.58E-06
EFAU004_01689	Aspartate racemase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	1708951	1709683	1450.62	926.79	1972.51	2.12	1.09	1.19E-08	1.23E-07
EFAU004_01789	sulfatase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	1812962	1815983	6918.74	284.63	10971.54	3.80	1.93	1.46E-23	1.41E-23
EFAU004_01905	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	1927073	1927766	51.97	28.60	77.35	2.70	1.44	0.001677052	0.012089742
EFAU004_01965	cytidyltransferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	1987982	1990642	205.09	105.32	303.86	2.77	1.47	0.004119615	0.013519397
EFAU004_01966	Polysaccharide biosynthesis protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	1990734	1991862	386.86	165.78	603.93	3.00	1.83	6.43E-06	3.80E-05
EFAU004_01967	Polysaccharide biosynthesis protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	1991915	1992155	50.30	23.42	77.18	3.30	1.72	0.000558517	0.002274451
EFAU004_01973	Capsular polysaccharide synthase protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	1996252	1997275	416.92	274.84	559.00	2.03	1.02	0.000543364	0.002216971
EFAU004_02052	hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2079877	2081174	49.53	28.51	70.54	2.47	1.31	0.001249813	0.008201558
EFAU004_02054	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2082407	2081793	2912.09	1310.64	4546.34	3.45	1.78	2.30E-20	1.27E-18
EFAU004_02126	cell division protein FtsK/SpoII	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2321331	2322779	506.65	317.32	695.77	2.19	1.13	7.61E-08	6.54E-07
EFAU004_02313	Mai ligase middle domain protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2347551	2348904	1137.03	710.56	1563.49	2.20	1.14	4.00E-05	0.000207867
EFAU004_02349	UDP-N-acetylmuramoyl-L-glutamate-L-histidine ligase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2608806	2610312	3467.39	1805.65	5529.14	3.06	1.61	1.35E-18	5.59E-17
EFAU004_02648	large conductance mechanosensitive channel protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2714588	2715050	29163.88	18635.11	39688.64	2.13	1.09	3.79E-05	0.000198716
EFAU004_00066	dihydrofolate reductase	H	Coenzyme transport and metabolism	68271	69295	2494.50	1031.48	3955.51	3.83	1.94	5.10E-09	5.67E-08
EFAU004_00074	pantoic acid kinase	H	Coenzyme transport and metabolism	76307	77031	855.51	581.14	1209.89	2.08	1.06	1.10E-07	9.10E-07
EFAU004_01700	putative oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	H	Coenzyme transport and metabolism	1724606	1725638	183.62	79.54	296.69	2.21	1.07	7.33E-14	1.73E-12
EFAU004_01710	riboflavin biosynthesis protein RibF	H	Coenzyme transport and metabolism	1739196	1739438	98.38	58.04	138.72	2.39	1.26	0.001618378	0.00194279
EFAU004_00650	HAD superfamily hydrolase	HR	Coenzyme transport and metabolism; General function prediction only	678013	678893	852.95	480.41	1216.50	2.40	1.31	6.28E-11	9.50E-10
EFAU004_01231	hydrolase, alpha/beta fold family protein	HR	Coenzyme transport and metabolism; General function prediction only	1261352	1262072	218.41	117.39	298.00	2.17	1.17	5.29E-05	0.000270084
EFAU004_00597	MutG nucleotide pyrophosphatase	V	Defense mechanisms	624041	624368	157.35	83.45	231.21	2.77	1.47	6.38E-07	4.51E-06
EFAU004_01360	Beta-lactamase	V	Defense mechanisms	1405224	1405954	1291.31	723.98	1858.63	2.57	1.36	1.54E-12	2.94E-11

EFAL004_02523	ABC transporter, ATP-binding protein	V	Defense mechanisms	2544085	2545423	259,25	123,30	395,20	3,21	1,68	6.60E-11	9.85E-10
EFAL004_02591	esterase	V	Defense mechanisms	2641855	2642444	806,20	499,75	1122,65	2,34	1,22	7.92E-11	1.16E-06
EFAL004_02802	ABC transporter, ATP-binding protein	V	Defense mechanisms	2669184	2670996	178,71	105,58	251,45	2,37	1,25	2.94E-05	0,00157393
EFAL004_02491	glykolytiske peroksidase	VI	Defense mechanisms; Lipid transport and metabolism	478818	477285	916,04	385,45	1442,83	3,74	1,90	1.01E-15	2.97E-14
EFAL004_02624	Na(+)-antiporter	C	Energy production and conversion	651548	658091	1,17,53	1003,41	2411,62	2,42	1,28	1.27E-11	2.10E-10
EFAL004_02112	ferredoxin	C	Energy production and conversion	1242870	1241202	122,81	39,06	185,57	3,16	1,66	0,022925258	0,052420956
EFAL004_02007	Glyoxyl-3-phosphatid dehydrogenase (NAD(P)H)	C	Energy production and conversion	2051768	2051794	784,35	435,17	1134,13	2,47	1,30	1.38E-12	7.62E-11
EFAL004_02575	Antibiotic biosynthesis monooxygenase	C	Energy production and conversion	2515302	2615395	258,69	136,44	380,54	2,79	1,48	0,032824921	0,075103455
EFAL004_02144	hypothetical protein	S	Function unknown	139426	133875	3335,73	1483,14	6182,31	4,15	2,05	8.83E-16	2.61E-14
EFAL004_02176	small secreted protein	S	Function unknown	275189	275540	338,34	1873,41	4353,06	2,11	1,14	1.15E-06	4.13E-05
EFAL004_02336	membrane protein	S	Function unknown	331506	331662	256,42	146,44	365,40	2,50	1,32	9.64E-05	0,004623188
EFAL004_02391	hypothetical protein	S	Function unknown	395088	395409	505,42	332,45	678,39	2,04	1,03	0,016214465	0,025924487
EFAL004_02411	hypothetical protein	S	Function unknown	422215	421877	631,01	380,54	907,08	2,52	1,38	7.60E-10	9.47E-09
EFAL004_02456	membrane protein	S	Function unknown	466848	467532	685,12	244,28	1133,36	4,64	2,21	2.73E-07	2.82E-06
EFAL004_02498	hypothetical protein	S	Function unknown	514815	515433	138,79	89,71	203,88	2,97	1,55	1.77E-07	1.95E-06
EFAL004_02547	hypothetical protein	S	Function unknown	567525	567507	5222,11	2086,76	8343,47	3,98	1,99	2.74E-16	8.77E-15
EFAL004_02582	hypothetical protein	S	Function unknown	606584	610421	162,42	81,55	143,28	2,98	1,58	3.52E-06	3.34E-07
EFAL004_02625	hypothetical protein	S	Function unknown	658507	658551	5343,67	3389,94	7227,40	2,36	1,24	1.62E-11	2.64E-10
EFAL004_02730	integral membrane protein	S	Function unknown	763761	764605	421,27	274,65	567,30	2,87	1,65	2.21E-06	1.46E-05
EFAL004_02750	hypothetical protein	S	Function unknown	789552	789578	2758,85	1853,85	3863,84	2,34	1,27	1.67E-09	1.98E-08
EFAL004_02872	hypothetical protein	S	Function unknown	883366	883897	4802,48	2837,02	5763,89	2,83	1,02	0,006103937	0,024537739
EFAL004_02922	hypothetical protein	S	Function unknown	936580	937657	7410,04	3135,47	11663,60	3,73	1,90	3.07E-17	1.07E-15
EFAL004_02961	integral membrane protein	S	Function unknown	996505	1000102	2588,93	890,32	4287,53	4,82	2,27	2.42E-32	5.01E-30
EFAL004_02018	hypothetical protein	S	Function unknown	1039147	1039755	6343,35	2396,82	9889,88	3,23	1,69	1.62E-05	1.94E-06
EFAL004_02063	N-S-thiosphoribosyltransferase family protein	S	Function unknown	1084247	1084539	316,39	180,61	443,24	2,33	1,22	0,001112383	0,00253193
EFAL004_02090	hypothetical protein	S	Function unknown	1113262	1113538	174,37	39,34	289,41	4,88	2,49	0,001118369	0,005320868
EFAL004_02189	hypothetical protein	S	Function unknown	1217373	1218203	2143,82	1043,31	3250,33	3,10	1,63	9.18E-15	3.86E-17
EFAL004_02101	putative membrane protein	S	Function unknown	1274578	1274844	476,65	307,49	645,90	2,10	1,07	7.38E-06	1.70E-05
EFAL004_02162	hypothetical protein	S	Function unknown	1579844	1579731	338,91	189,20	490,52	2,59	1,37	9.91E-09	1.05E-07
EFAL004_02106	hypothetical protein	S	Function unknown	1729786	1730155	289,60	157,18	422,02	2,68	1,42	6.88E-05	7.41E-08
EFAL004_02147	hypothetical protein	S	Function unknown	1773714	1776380	436,61	231,99	551,63	2,96	1,56	2.88E-08	2.53E-07
EFAL004_02159	hypothetical protein	S	Function unknown	1784217	1784702	1543,36	1517,77	3384,15	2,26	1,18	0,000922458	0,005632011
EFAL004_02080	hypothetical protein	S	Function unknown	2050250	2050691	2479,97	1058,73	3901,21	3,68	1,88	2.71E-16	1.05E-16
EFAL004_02055	membrane protein	S	Function unknown	2081895	2082126	190,02	61,93	318,11	5,14	2,36	8.14E-07	5.66E-06
EFAL004_02083	hypothetical protein	S	Function unknown	2109237	2109475	526,74	194,59	855,89	4,41	2,14	1.64E-05	9.06E-05
EFAL004_02177	Sulfite reductase ThiS/ThiF	S	Function unknown	2158245	2158987	738,05	461,28	1014,81	2,30	1,14	9.82E-09	1.04E-07
EFAL004_02158	hypothetical protein	S	Function unknown	2188789	2189521	454,26	143,67	785,26	5,33	2,41	4.62E-25	4.26E-23
EFAL004_02169	hypothetical protein	S	Function unknown	2189535	2190216	86,10	49,89	122,20	2,44	1,29	0,001033951	0,004043227
EFAL004_02210	hypothetical protein	S	Function unknown	2237624	2238458	418,57	238,27	599,76	2,51	1,33	1.13E-09	1.36E-08
EFAL004_02217	hypothetical protein	S	Function unknown	2244761	2245135	15809,80	7745,47	24035,13	3,10	1,63	7.67E-08	6.57E-07
EFAL004_02275	hydrolase, NADH family	S	Function unknown	2300797	2309619	675,58	415,38	1434,79	3,45	1,78	8.77E-15	3.77E-17
EFAL004_02291	VbaI (only)-RNA synthetase-associated domain protein	S	Function unknown	2328330	2328315	133,70	61,37	286,02	3,36	1,75	1.22E-08	1.25E-07
EFAL004_02448	hypothetical protein	S	Function unknown	2468217	2468707	89,33	47,30	131,36	2,79	1,47	3.87E-05	0,002322228
EFAL004_02478	adenylate cyclase	S	Function unknown	2484842	2485219	385,88	155,21	618,56	4,04	2,01	2.68E-15	7.28E-14
EFAL004_02627	hypothetical protein	S	Function unknown	2588860	2589751	1342,01	665,42	1818,61	2,10	1,07	2.14E-08	2.10E-07
EFAL004_02837	hypothetical protein	S	Function unknown	2912349	2912974	650,51	408,56	906,47	2,23	1,16	1.33E-10	1.88E-09
EFAL004_02418	putative permease	R	General function prediction only	159497	160676	4808,22	2338,08	6678,46	2,27	1,18	7.26E-11	1.07E-09
EFAL004_02541	Calcineurin-like phosphoesterase	R	General function prediction only	502415	503015	702,73	472,03	1066,54	2,26	1,17	9.64E-09	1.03E-07
EFAL004_02167	oxidoreductase family, NAD-binding Rossmann fold protein	R	General function prediction only	684696	685617	1140,08	837,33	1657,84	2,63	1,40	1.31E-17	2.59E-11
EFAL004_02791	acyltransferase	R	General function prediction only	823667	823849	636,57	401,29	877,85	2,19	1,13	4.37E-08	4.90E-07
EFAL004_02935	oxidoreductase family, NAD-binding Rossmann fold protein	R	General function prediction only	952951	952983	385,12	152,18	626,06	4,11	2,04	5.11E-18	1.94E-16
EFAL004_02046	nitroreductase family protein	R	General function prediction only	1073672	1074269	1270,98	690,45	1881,51	2,85	1,51	2.57E-14	6.34E-13
EFAL004_02172	CoA-binding domain protein	R	General function prediction only	1202218	1202553	942,38	454,24	1430,51	3,15	1,66	8.53E-13	1.67E-11
EFAL004_02138	permease	R	General function prediction only	1365412	1366531	4896,90	2315,20	6878,59	2,36	1,24	1.20E-11	2.00E-10
EFAL004_02533	Acyltransferase, GWT family	R	General function prediction only	1548658	1550179	612,18	305,20	915,08	3,01	1,59	2.17E-13	4.71E-12
EFAL004_02551	Inhibitor of acetoacetyl-promoting band	R	General function prediction only	1568304	1568388	3350,82	1988,88	4702,75	2,35	1,23	2.62E-11	4.18E-10
EFAL004_02158	rhodanese-like domain protein	R	General function prediction only	1576540	1576587	297,84	171,01	417,66	2,39	1,25	2.48E-07	1.87E-06
EFAL004_02618	Zeta toxin	R	General function prediction only	1639848	1637403	598,56	361,67	835,46	2,31	1,21	0,00226411	0,009338948

EFAL004_01667	hypothetical protein	R	General function prediction only	1861509	1686442	226,25	113,77	333,73	2,81	1,49	6,55E-05	0,000328796
EFAL004_01702	Df-1/PlfA family protein	R	General function prediction only	1759499	1727950	1311,19	372,30	3450,09	9,27	3,21	2,72E-29	3,67E-27
EFAL004_01746	hypothetical protein	R	General function prediction only	1773396	1775713	1865,26	550,41	2820,10	2,97	1,57	7,56E-17	2,56E-15
EFAL004_01770	hypothetical protein	R	General function prediction only	1795595	1796015	1531,27	696,67	2363,67	3,38	1,76	3,16E-19	1,44E-17
EFAL004_01771	carboxymethylolactone decarboxylase family protein	R	General function prediction only	1796015	1796360	737,24	271,25	1203,34	4,44	2,15	8,82E-25	8,53E-23
FFAL004_01945	hypothetical protein	R	General function prediction only	1894954	1861154	1717,98	385,74	2866,68	3,40	1,77	4,71E-19	2,09E-17
EFAL004_01938	HD domain protein	R	General function prediction only	1963568	1964072	2232,85	1094,61	3371,10	3,08	1,62	1,14E-05	6,43E-05
EFAL004_02046	hypothetical protein	R	General function prediction only	2073735	2076380	440,15	243,81	636,50	2,61	1,38	3,17E-09	3,60E-08
EFAL004_02058	Acetyltransferase, GNA7 family	R	General function prediction only	2093445	2093724	9220,48	5395,86	12744,03	2,24	1,15	3,70E-06	2,33E-05
EFAL004_02178	ABC transporter, ATP-binding protein	R	General function prediction only	2198842	2200777	1731,13	1061,21	2407,06	2,27	1,18	3,05E-10	4,16E-09
EFAL004_02193	Carbonic anhydrase/acyltransferase	R	General function prediction only	2217133	2219719	286,75	135,53	447,57	3,57	1,84	1,38E-13	3,12E-12
FFAL004_02311	hypothetical protein	R	General function prediction only	2343130	2345268	117,80	58,47	177,18	3,04	1,60	1,77E-07	1,94E-06
EFAL004_02314	CobB/CobQ-like glutamine amidotransferase domain protein	R	General function prediction only	2348896	2349395	533,39	610,21	1256,56	2,06	1,04	1,09E-07	8,94E-07
EFAL004_02421	NADH-flavin reductase	R	General function prediction only	2439325	2439555	1383,32	724,44	2452,20	3,38	1,76	8,89E-20	4,43E-18
EFAL004_02731	ata toxin	R	General function prediction only	2792559	2793333	3943,21	1030,32	6855,50	6,65	2,73	1,12E-06	1,17E-07
EFAL004_02458	transcriptional regulator Spx family	P	Inorganic ion transport and metabolism	470281	470692	1773,48	621,49	2825,47	4,71	2,28	5,54E-13	1,14E-11
EFAL004_02459	transcriptional regulator, Spw/MgrB family	P	Inorganic ion transport and metabolism	470705	470652	1861,42	735,28	2896,56	4,13	2,04	8,85E-26	8,82E-24
FFAL004_02499	ABC transporter ATP-binding protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	505470	505317	381,11	155,50	695,73	3,90	1,96	1,20E-15	1,49E-14
EFAL004_02490	metal ion ABC transporter, permease protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	505513	505358	542,35	295,74	784,56	2,62	1,39	6,01E-11	9,83E-10
EFAL004_02491	periplasmic solute binding protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	505513	507104	1137,49	689,62	1671,16	2,77	1,47	8,56E-14	2,05E-12
EFAL004_02700	Cox-like Mg2+ transporter protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	791156	792113	2489,29	739,49	4077,06	5,51	2,45	1,02E-15	5,30E-14
EFAL004_02856	zinc/magnesium transporter family protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	865202	866417	915,64	215,50	1615,78	7,50	2,91	1,28E-07	1,05E-06
EFAL004_02890	cation diffusion facilitator family transporter	P	Inorganic ion transport and metabolism	892325	893684	682,12	429,80	939,43	2,21	1,14	1,67E-08	1,66E-07
FFAL004_01273	transcriptional regulator, FixA family	P	Inorganic ion transport and metabolism	1749480	1750444	1270,40	649,14	1791,77	2,75	1,45	7,93E-18	6,69E-17
EFAL004_01348	superoxide dismutase, Mn	P	Inorganic ion transport and metabolism	1953234	1955849	8992,83	23918,25	111697,41	4,01	2,00	4,02E-12	2,43E-20
EFAL004_01330	cation diffusion facilitator family transporter	P	Inorganic ion transport and metabolism	1994445	1997945	857,08	428,40	1285,77	3,00	1,59	0,000108523	0,000505589
EFAL004_01657	voltage-gated chloride transporter, chloride channel family protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	1674544	1676104	483,53	245,57	721,49	2,94	1,55	8,44E-12	1,44E-10
EFAL004_01636	voltage-gated chloride channel family protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	1961380	1962343	135,70	88,59	183,21	2,06	1,05	0,000423566	0,001820155
EFAL004_02013	metal ion transporter	P	Inorganic ion transport and metabolism	2059166	2041353	36790,45	21418,99	52131,91	2,43	1,28	2,42E-12	4,52E-11
EFAL004_02039	adhesion lipoprotein	P	Inorganic ion transport and metabolism	2875380	2876191	6345,89	3415,49	8875,29	2,60	1,38	7,01E-05	0,000347173
EFAL004_02810	metal ion ABC transporter, permease protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	2878027	2878870	1137,55	630,33	1944,78	2,61	1,38	4,35E-06	2,70E-05
EFAL004_02811	ABC transporter, ATP-binding protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	2878470	2879211	5112,78	1908,57	8316,99	4,36	2,12	4,12E-27	4,37E-25
EFAL004_02138	proton-stimulated, YqC subunit	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	236807	237186	7011,64	4461,21	9562,48	2,14	1,10	0,000347921	0,001530492
EFAL004_02152	channel protein, hemolysin III family protein	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	1200123	1200777	742,16	351,01	1133,32	3,23	1,69	1,69E-15	4,78E-14
EFAL004_02138	signal peptidase	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	1242863	1243433	638,77	257,74	1020,10	3,96	1,99	0,000233796	0,000916617
EFAL004_02458	proton-stimulated, SecE subunit	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	2475150	2476211	130,60	57,68	203,52	3,53	1,82	0,000601377	0,004226212
EFAL004_02532	bacterial ABC transporter protein Ec58	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	2543401	2544939	425,79	223,37	628,21	2,81	1,49	4,01E-11	6,19E-10
EFAL004_02022	DagV family protein	I	Lipid transport and metabolism	22354	23218	2085,52	1322,52	2889,93	2,09	1,02	4,04E-08	3,77E-07
EFAL004_02219	halo[acyl-carrier-protein] synthase	I	Lipid transport and metabolism	212151	212112	477,87	293,43	650,21	2,22	1,15	3,98E-07	2,50E-06
EFAL004_01349	cell wall teichoic acid glycosylation protein OxaA family protein	I	Lipid transport and metabolism	1395527	1396399	401,47	262,13	540,20	2,06	1,04	0,000874257	0,000802788
EFAL004_01352	MscK-like domain protein	I	Lipid transport and metabolism	1568680	1569465	832,36	537,30	1127,61	2,10	1,07	2,99E-08	2,87E-07
EFAL004_02216	alpha/beta hydrolase family protein	I	Lipid transport and metabolism	2244319	2244843	334,36	126,57	520,26	4,04	2,02	4,63E-16	1,43E-14
FFAL004_01198	alpha/beta hydrolase fold protein	I	Lipid transport and metabolism	2315245	2316194	2074,06	1186,59	2861,54	2,45	1,29	1,99E-11	1,03E-10
EFAL004_02644	COP-diacylglycerol-acyl-CoA:3-phosphatidylserine transferase	I	Lipid transport and metabolism	2709340	2709919	808,30	420,25	1196,34	2,85	1,51	3,88E-12	6,93E-11
EFAL004_02557	diacylglycerol kinase catalytic subunit	R	Lipid transport and metabolism; General function prediction only	613634	614519	2410,16	1266,11	3554,21	2,81	1,49	3,29E-16	1,04E-14
EFAL004_02946	toxin-antitoxin system, toxin component, Tc1 family	X	Mobility: prophages, transposons	944661	965060	1381,87	1115,17	2848,56	2,55	1,35	4,79E-13	9,85E-12
EFAL004_02935	hypothetical protein	X	Mobility: prophages, transposons	1013211	1016451	211,49	115,64	386,34	2,63	1,39	1,22E-07	9,96E-07
EFAL004_01589	IS64 family transposase	X	Mobility: prophages, transposons	1507339	1608995	481,23	188,72	774,44	4,12	2,04	3,98E-20	1,97E-18
FFAL004_01591	IS64 (Int2)-like protein	X	Mobility: prophages, transposons	1608617	1609163	88,78	46,74	130,61	2,80	1,48	0,000126576	0,000607699
EFAL004_01707	DNA binding domain, excisionase family	X	Mobility: prophages, transposons	1750619	1751072	220,55	87,29	353,81	4,05	2,02	5,06E-13	1,05E-11
EFAL004_01955	Integrase core domain protein	X	Mobility: prophages, transposons	1978512	1978465	15,76	7,87	23,65	3,01	1,59	0,030828127	0,074889732
EFAL004_02054	hypothetical protein	--	Not in GOs	35849	56071	35,78	19,44	52,13	2,68	1,42	0,016469444	0,044001379
EFAL004_02057	hypothetical protein	--	Not in GOs	57528	58147	882,98	542,73	1223,22	2,25	1,17	2,32E-07	1,76E-06
EFAL004_02136	hypothetical protein	--	Not in GOs	178211	178586	2722,25	671,94	4572,77	5,21	2,39	2,47E-09	2,88E-08
FFAL004_01193	hypothetical protein	--	Not in GOs	186465	186857	868,97	443,28	1794,06	2,97	1,54	0,001919447	0,010461977
EFAL004_02192	bacteriokin, bacteriocin 972	--	Not in GOs	290837	291212	339,17	221,67	456,56	2,06	1,04	4,94E-05	0,000233255
EFAL004_02314	hypothetical protein	--	Not in GOs	305521	310157	940,58	376,85	1594,31	3,99	2,00	1,22E-12	1,04E-11
EFAL004_02432	hypothetical protein	--	Not in GOs	440830	441128	194,56	94,68	305,04	3,50	1,85	9,13E-08	7,62E-07

EFAL004_00454	hypothetical protein	+	Net in GOGs	465530	465737	847,62	464,64	1230,61	2,85	1,41	0,000254935	0,001186521
EFAL004_00511	hypothetical protein	+	Net in GOGs	524736	524922	30,60	17,21	43,59	2,56	1,35	0,025703127	0,0773914
EFAL004_00512	hypothetical protein	+	Net in GOGs	525426	525621	56,79	36,38	97,19	2,67	1,42	0,000749268	0,002945513
EFAL004_00536	hypothetical protein	+	Net in GOGs	554985	555861	2009,94	1071,19	2966,69	7,93	1,55	6,74E-16	7,04E-14
EFAL004_00586	hypothetical protein	+	Net in GOGs	613102	613540	44,36	13,99	74,74	5,35	2,42	4,65E-06	2,86E-05
EFAL004_00759	hypothetical protein	+	Net in GOGs	795967	799084	107,51	51,19	166,62	3,20	1,68	2,42E-07	1,85E-06
EFAL004_00822	hypothetical protein	+	Net in GOGs	838139	838312	6,74	0,36	12,92	23,28	4,54	0,02008668	0,029021586
EFAL004_00904	hypothetical protein	+	Net in GOGs	915749	917667	1544,37	460,17	2028,58	6,15	2,62	9,87E-31	1,46E-28
EFAL004_00925	hypothetical protein	+	Net in GOGs	917629	918733	4482,16	2365,27	6229,05	2,79	1,48	1,63E-16	5,42E-15
EFAL004_00914	hypothetical protein	+	Net in GOGs	919625	920805	774,17	195,24	985,71	2,45	1,29	5,76E-08	5,17E-07
EFAL004_00936	hypothetical protein	+	Net in GOGs	954071	954377	4300,49	1010,94	7390,05	7,51	2,91	1,25E-10	1,77E-09
EFAL004_00956	hypothetical protein	+	Net in GOGs	979140	979284	5782,53	3354,67	8010,40	2,35	1,17	9,80E-11	1,42E-09
EFAL004_01130	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1188893	1187634	4082,01	2660,39	5503,43	2,07	1,05	5,70E-07	4,07E-06
EFAL004_01155	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1192921	1191454	182,89	132,42	245,26	2,04	1,03	0,000321485	0,001370208
EFAL004_01325	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1934837	1935485	3391,11	1125,05	5055,57	5,03	2,33	1,37E-12	8,79E-11
EFAL004_01470	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1495350	1495424	161,88	52,94	270,91	5,12	2,35	5,46E-14	1,32E-12
EFAL004_01471	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1497069	1497537	67,97	35,08	100,96	2,88	1,52	0,000599887	0,002314146
EFAL004_01496	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1507917	1508172	465,90	161,15	770,66	4,78	2,26	3,49E-09	3,17E-08
EFAL004_01498	Pyrimidine dimer DNA glycosylase	+	Net in GOGs	1508562	1508328	1044,64	620,29	1469,29	2,32	1,21	1,67E-06	1,23E-06
EFAL004_01499	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1508988	1508287	32,22	14,81	40,63	3,35	1,74	0,001483164	0,005445011
EFAL004_01575	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1541095	1541492	295,55	174,70	467,41	3,71	1,69	1,01E-14	7,64E-13
EFAL004_01535	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1550985	1551357	247,48	152,74	342,22	2,34	1,16	3,20E-06	2,04E-05
EFAL004_01590	16S6 family transposase	+	Net in GOGs	1608651	1608858	41,10	10,18	72,02	7,07	2,82	3,94E-07	2,82E-06
EFAL004_01663	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1704207	1704389	90,76	32,09	69,49	2,17	1,12	0,015818496	0,043513652
EFAL004_01694	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1704775	1705402	13,15	5,37	20,53	3,90	1,56	0,038957717	0,091763949
EFAL004_01701	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1725788	1726015	246,82	117,51	375,73	3,19	1,67	3,12E-09	3,56E-08
EFAL004_01703	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1727279	1727993	686,36	169,85	1307,87	7,08	2,87	6,67E-16	5,45E-15
EFAL004_01745	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1737677	1737845	1304,92	453,11	2156,72	4,76	2,25	1,83E-14	4,59E-13
EFAL004_01782	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1863380	1863717	29,79	17,31	42,26	2,41	1,29	0,012579312	0,04880494
EFAL004_01799	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1824761	1825222	1172,34	335,56	2007,13	5,98	2,58	1,08E-05	6,13E-05
EFAL004_01888	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1912623	1912883	430,46	227,15	633,77	2,70	1,48	1,50E-09	1,79E-08
EFAL004_01885	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1920035	1920299	6752,28	4463,09	13041,47	2,92	1,55	7,43E-10	9,30E-09
EFAL004_01906	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1924200	1924777	585,93	190,77	980,28	4,91	2,29	1,49E-10	2,06E-09
EFAL004_01933	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1984888	1984811	7,70	1,57	13,83	8,79	3,14	0,015598978	0,042032167
EFAL004_01998	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1991251	1992721	208,24	100,37	316,32	3,16	1,66	0,001570761	0,026750983
EFAL004_01969	hypothetical protein	+	Net in GOGs	1992566	1993239	83,37	31,66	135,07	4,27	2,09	0,010999903	0,031041002
EFAL004_01993	extensin immunity protein	+	Net in GOGs	2006572	2006634	39,73	12,68	66,90	5,29	2,40	0,00033874	0,004637872
EFAL004_02048	hypothetical protein	+	Net in GOGs	2077965	2077537	1919,74	976,57	2861,91	7,93	1,55	0,001431931	0,001815121
EFAL004_02053	hypothetical protein	+	Net in GOGs	2080908	2080485	485,80	230,50	741,11	3,22	1,68	2,26E-14	5,45E-13
EFAL004_02128	hypothetical protein	+	Net in GOGs	2169623	2169290	1050,71	655,92	1415,50	2,20	1,14	2,82E-05	0,001320965
EFAL004_02148	hypothetical protein	+	Net in GOGs	2174434	2175304	315,09	159,21	477,07	3,12	1,64	8,59E-12	1,45E-10
EFAL004_02149	hypothetical protein	+	Net in GOGs	2175252	2175483	24,50	5,92	42,26	7,30	2,87	6,98E-05	0,000346577
EFAL004_02170	hypothetical protein	+	Net in GOGs	2195066	2195947	145,32	92,20	195,44	2,15	1,11	0,000131392	0,000611722
EFAL004_02194	hypothetical protein	+	Net in GOGs	2217771	2217969	391,25	140,07	540,43	4,38	2,13	5,79E-06	3,47E-05
EFAL004_02221	hypothetical protein	+	Net in GOGs	2252778	2253141	5388,08	1072,19	8765,17	4,20	2,07	6,67E-05	0,000339209
EFAL004_02281	hypothetical protein	+	Net in GOGs	2315213	2315961	88,99	47,95	130,24	2,71	1,44	0,001411766	0,006930979
EFAL004_02335	hypothetical protein	+	Net in GOGs	2372294	2372629	877,45	332,44	1432,46	4,44	2,15	3,89E-10	4,53E-09
EFAL004_02508	hypothetical protein	+	Net in GOGs	2521445	2521574	378,40	204,40	552,41	2,70	1,43	3,12E-10	4,20E-09
EFAL004_02576	hypothetical protein	+	Net in GOGs	2615473	2616544	230,83	148,38	313,29	2,11	1,08	0,000294759	0,00358352
EFAL004_02714	hypothetical protein	+	Net in GOGs	2779509	2774600	9,98	7,13	17,83	8,37	3,07	0,0074939	0,074486071
EFAL004_02718	hypothetical protein	+	Net in GOGs	2778903	2779515	340,86	181,51	500,21	2,76	1,46	3,35E-09	3,77E-08
EFAL004_02732	hypothetical protein	+	Net in GOGs	2793325	2793490	3037,75	808,88	5366,63	6,51	2,70	3,10E-18	1,23E-16
EFAL004_02807	hypothetical protein	+	Net in GOGs	2874710	2874893	81,99	23,79	144,19	6,06	2,60	2,04E-11	3,27E-10
EFAL004_02830	hydrolase, NUDIX family	F	Nucleotide transport and metabolism	305561	302167	252,40	137,10	360,50	2,60	1,43	1,05E-08	1,10E-07
EFAL004_02635	putative Baauprotein NrdB	F	Nucleotide transport and metabolism	665587	665644	336,55	277,89	451,21	2,07	1,07	0,000438929	0,001839387
EFAL004_02797	Uridyl phosphoryltransferase	F	Nucleotide transport and metabolism	7354483	7355113	4832,10	3173,73	6520,96	7,09	1,06	4,13E-09	4,59E-08
EFAL004_02304	Thymidine kinase	F	Nucleotide transport and metabolism	2340892	2341477	594,21	392,31	1392,31	2,34	1,22	1,33E-07	1,08E-06
EFAL004_02625	Guanylate kinase	F	Nucleotide transport and metabolism	2687457	2688072	721,61	396,52	1096,80	2,61	1,40	4,74E-06	2,92E-05

EFAL004_00337	ribose-phosphate pyrophosphokinase	FE	Nucleotide transport and metabolism; Amino acid transport and metabolism	555940	555915	3277.22	2273.47	5480.58	2.41	1.27	3.27E-12	5.89E-11
EFAL004_00332	peptide methionine sulfoxide reductase msaA	O	Posttranslational modification; protein turnover; chaperones	317839	318073	285.09	84.52	485.05	5.75	2.52	1.14E-10	1.63E-09
EFAL004_00435	SPFH domain / BamF 7 family protein	O	Posttranslational modification; protein turnover; chaperones	441378	442251	654.93	361.56	948.29	2.62	1.39	6.60E-11	9.85E-10
EFAL004_00024	pectin lyase/alpha-trans-galactosidase, cyclophilin-type	O	Posttranslational modification; protein turnover; chaperones	1040109	1046870	886.79	577.58	1196.01	2.07	1.05	0.011530206	0.034404622
EFAL004_00003	thiorodan reductase	O	Posttranslational modification; protein turnover; chaperones	2027378	2028365	1254.84	590.77	1918.92	3.25	1.70	3.85E-05	0.000176322
EFAL004_00232	ATK-dependent Dlo protease proteolytic subunit	O	Posttranslational modification; protein turnover; chaperones	2226436	2217130	335.51	188.59	4547.41	2.10	1.07	4.19E-09	4.63E-08
EFAL004_00235	Enterocin A immunity	O	Posttranslational modification; protein turnover; chaperones	2311747	2332147	3048.73	2012.96	4084.80	2.83	1.02	1.95E-07	1.24E-06
EFAL004_00044	recombination protein E_RecF_1	L	Replication; recombination and repair	46029	48219	153.46	107.19	2197.73	2.05	1.03	1.20E-07	9.85E-07
EFAL004_00993	acetyltransferase, GNA1 family	L	Replication; recombination and repair	1003931	1003763	391.48	163.12	619.94	3.80	1.99	1.51E-08	1.52E-07
EFAL004_01072	DNA polymerase II, delta subunit	L	Replication; recombination and repair	1093841	1094888	683.56	425.37	954.56	2.34	1.17	3.91E-05	0.000202954
EFAL004_01235	DNA-binding protein HU	L	Replication; recombination and repair	1233614	1233890	5152.31	1705.19	8598.49	5.04	2.33	4.34E-13	9.20E-12
EFAL004_01692	endonuclease ARC, subunit B	L	Replication; recombination and repair	1714740	1718235	2025.89	1327.87	2722.91	2.05	1.04	3.51E-08	3.37E-07
FFAL004_01800	site-specific tyrosine recombinase XerC-family	L	Replication; recombination and repair	1847943	1844027	2833.54	835.76	4844.82	5.85	2.55	7.09E-40	2.36E-37
EFAL004_01928	DnaQ family exonuclease/DnaG family helicase	L	Replication; recombination and repair	1952425	1952125	894.48	585.24	1203.72	2.06	1.04	7.14E-08	6.20E-07
EFAL004_01236	endonuclease ARC, subunit C	L	Replication; recombination and repair	2124866	2134945	2462.27	1541.18	3450.86	2.25	1.17	6.94E-10	8.00E-09
FFAL004_01111	ribonuclease HI	L	Replication; recombination and repair	2138647	2139865	338.88	175.74	548.73	4.35	2.09	1.69E-17	6.16E-16
EFAL004_00303	DNA-mismatch repair protein	L	Replication; recombination and repair	2750243	2750393	513.08	255.20	782.26	3.05	1.62	2.91E-13	4.79E-12
EFAL004_01098	lactoylglutathione lyase	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	2113266	2113638	20880.88	9126.00	32635.35	3.53	1.82	1.89E-24	1.59E-22
FFAL004_00325	glyoxalase family protein	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	2381815	2383985	1497.91	1106.46	3389.37	3.57	1.81	1.78E-07	1.95E-06
EFAL004_00011	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	10180	10726	1440.63	876.54	2002.72	2.28	1.19	9.52E-10	1.16E-08
EFAL004_00947	putative addition module endotide	T	Signal transduction mechanisms	969096	965291	450.24	272.80	627.87	2.30	1.20	0.009378361	0.011317069
FFAL004_01674	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	1691419	1694307	1374.10	804.73	1943.77	2.47	1.27	0.001951481	0.001508196
EFAL004_01737	cyclic nucleotide-binding domain protein	T	Signal transduction mechanisms	1765707	1765400	674.38	3027.13	15402.63	3.44	1.28	2.48E-22	1.55E-20
EFAL004_01995	KH domain-containing protein	T	Signal transduction mechanisms	2019579	2020551	1298.89	653.43	1594.85	2.36	1.24	3.76E-10	4.98E-09
EFAL004_00000	Putative phosphotransferase	T	Signal transduction mechanisms	2024103	2024981	506.24	171.55	495.93	4.09	2.03	8.82E-17	2.97E-15
EFAL004_00029	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	2093033	2094805	837.88	480.68	1186.00	2.42	1.28	3.72E-10	4.95E-09
EFAL004_00053	histidine kinase	T	Signal transduction mechanisms	2936388	2939597	1305.23	862.53	1746.93	2.02	1.02	7.34E-08	6.33E-07
FFAL004_00425	DNA-binding response regulator	TK	Signal transduction mechanisms; Transcription	435062	435331	99.75	55.54	142.96	2.57	1.36	0.001574969	0.001316677
EFAL004_00524	DNA-binding response regulator	TK	Signal transduction mechanisms; Transcription	540334	540309	340.24	211.53	458.25	2.07	1.05	0.000274275	0.001209556
EFAL004_00286	DNA-binding response regulator	TK	Signal transduction mechanisms; Transcription	1327563	1328282	1389.52	522.99	1856.04	2.01	1.01	1.33E-07	1.08E-06
FFAL004_00695	response regulator receiver domain protein	TK	Signal transduction mechanisms; Transcription	2799676	2798936	113.25	74.14	152.36	2.05	1.04	0.001944177	0.009498571
EFAL004_00282	putative regulatory protein VanH	TK	Signal transduction mechanisms; Transcription	2307712	2308402	2375.29	1027.84	3712.74	3.58	1.84	7.32E-13	1.46E-11
EFAL004_00252	YnfK transcriptional regulator	K	Transcription	252657	253216	475.01	175.88	782.85	4.45	2.15	3.13E-19	1.41E-17
FFAL004_00343	hypothetical protein	K	Transcription	343323	343686	618.00	366.65	869.34	2.37	1.25	1.14E-07	9.43E-07
EFAL004_00399	transcriptional regulator, TetR family	K	Transcription	402194	402764	154.93	96.63	213.22	2.21	1.14	0.027788952	0.036838011
EFAL004_00443	Lac family sugar binding transcriptional regulator	K	Transcription	452057	453073	695.71	444.22	955.20	2.15	1.10	1.71E-07	1.35E-06
EFAL004_00586	HWR-like helix-turn-helix protein	K	Transcription	623691	623919	35.75	19.33	38.17	4.36	2.13	0.000334001	0.000623832
EFAL004_00603	transcriptional regulator, GntR family	K	Transcription	629660	630562	282.31	175.23	405.39	2.25	1.18	2.20E-07	1.69E-06
EFAL004_00663	hypothetical protein	K	Transcription	693083	693890	894.51	494.20	1304.73	2.69	1.43	4.24E-12	7.55E-11
EFAL004_00661	transcriptional regulator, MerR family	K	Transcription	729562	729555	143.78	80.82	206.75	2.56	1.36	2.44E-06	1.61E-05
EFAL004_00751	transcription antitermination factor NusB	K	Transcription	789970	794420	3211.33	1971.16	4451.51	2.20	1.18	1.01E-10	1.45E-09
EFAL004_00859	hypothetical protein	K	Transcription	869081	870490	4612.03	917.47	8318.99	9.07	3.18	3.81E-29	4.48E-27
EFAL004_00928	TetR/AcrR family transcriptional regulator	K	Transcription	941328	942376	297.21	147.54	446.88	3.03	1.60	5.34E-10	6.88E-09
EFAL004_01002	transcriptional regulator, MerR family	K	Transcription	1023328	1023772	191.33	106.21	274.44	2.54	1.34	7.80E-07	5.40E-06
EFAL004_01140	helic turn-helix protein	K	Transcription	1169172	1170009	3065.72	1785.07	4256.38	2.37	1.24	1.51E-11	2.45E-10
EFAL004_01325	transcriptional regulator, MerR family	K	Transcription	1370616	1371257	2392.20	1394.38	3190.09	2.01	1.00	6.61E-08	5.89E-07
EFAL004_01472	helic-turn-helix domain-containing protein	K	Transcription	1497545	1497773	56.68	38.97	94.58	2.42	1.28	0.000703743	0.003717877
EFAL004_01487	toxin antitoxin system, antitoxin component, Arc domain protein	K	Transcription	1508241	1508487	687.51	341.54	1093.48	3.03	1.60	7.65E-13	1.51E-11
EFAL004_01491	major cold shock protein CspA	K	Transcription	1511644	1511842	1643.96	781.50	2342.43	3.25	1.70	4.83E-07	1.45E-06
EFAL004_01525	phosphosugar isomerase transcriptional regulator	K	Transcription	1521214	1522263	686.11	294.63	1077.59	3.66	1.87	2.97E-09	3.41E-08
EFAL004_01546	transcriptional repressor NirR	K	Transcription	1562872	1563364	732.12	350.16	1114.07	3.19	1.67	1.96E-14	3.54E-13
EFAL004_01635	CoxI family transcriptional regulator	K	Transcription	1611388	1611785	331.40	209.47	493.33	2.16	1.11	5.54E-06	3.34E-05
EFAL004_01729	arginine repressor protein	K	Transcription	1755823	1757363	1545.44	937.32	2353.57	2.51	1.33	6.90E-12	1.21E-10
EFAL004_01806	transcriptional regulator, LysR family	K	Transcription	1800744	1811250	180.25	80.82	297.68	3.68	1.88	7.23E-12	1.25E-10
EFAL004_01807	Transcriptional regulator, MerR family	K	Transcription	1811070	1811448	81.31	45.54	117.08	2.57	1.36	0.01298991	0.048489607
EFAL004_01804	RNA polymerase sigma-70 factor, region 4	K	Transcription	1845290	1845719	10.53	3.24	17.83	5.50	2.46	0.025984937	0.047381113
EFAL004_01839	sucrose operon repressor SorR	K	Transcription	1860257	1861038	270.78	160.70	382.85	2.38	1.25	0.011393498	0.044432623
EFAL004_01006	phosphosugar-binding transcriptional regulator	K	Transcription	2011516	2012413	387.19	215.88	556.49	2.59	1.37	1.02E-09	1.24E-08

EFAL004_02017	catabolic control protein A	K	Transcription	2047269	2048271	922825	3998.07	1409.95	3.51	1.81	2.71E-06	1.77E-05
EFAL004_02047	transcriptional regulator, GntR family	K	Transcription	2070433	2077147	1541.00	715.64	2566.35	3.50	1.84	1.30E-07	1.12E-06
EFAL004_02077	SoC family transcriptional regulator	K	Transcription	2102862	2103900	8790.02	4136.09	18448.95	3.25	1.70	0.008877969	0.025988711
EFAL004_02078	RNA polymerase factor sigma-54	K	Transcription	2104102	2105437	823.82	532.76	1121.19	2.15	1.10	3.87E-08	3.64E-07
EFAL004_02092	DNA-directed RNA polymerase, delta subunit	K	Transcription	2108341	2108362	7155.33	3352.35	11678.32	3.01	1.59	4.80E-08	4.40E-07
EFAL004_02117	M protein trans-acting positive regulator	K	Transcription	2145317	2146036	140.69	85.67	195.25	2.39	1.19	8.15E-05	0.003940075
EFAL004_02177	redox sensitive transcriptional regulator	K	Transcription	2197590	2198517	938.11	591.83	1291.89	2.29	1.19	0.008707941	0.018569144
EFAL004_02336	LacI family sugar-binding transcriptional regulator	K	Transcription	2295354	2307270	650.32	287.26	1033.37	3.53	1.82	1.00E-08	1.00E-07
EFAL004_02413	helicium-helic domain-containing protein	K	Transcription	2431937	2431943	154.10	84.04	774.36	2.67	1.47	5.30E-06	3.72E-05
EFAL004_02590	transcriptional regulator, TetR family	K	Transcription	2641120	2641769	793.84	502.28	1005.41	2.00	1.00	6.84E-07	4.82E-06
EFAL004_02624	DNA-directed RNA polymerase, omega subunit	K	Transcription	2687147	2687953	450.32	296.77	603.67	2.03	1.02	3.36E-06	2.13E-05
EFAL004_02675	transcriptional regulator, LydJ family	K	Transcription	2735008	2740501	211.49	131.57	301.06	2.47	1.30	2.44E-07	1.80E-06
EFAL004_02734	hypothetical protein	K	Transcription	2784558	2785134	350.16	229.55	471.78	2.06	1.05	0.003234963	0.02244316
EFAL004_02806	transcriptional regulator	K	Transcription	2873917	2874436	667.16	242.70	1091.61	4.50	2.17	6.26E-07	4.46E-06
EFAL004_02830	transcriptional regulator, LacI family	K	Transcription	2898516	2899542	226.64	150.05	307.22	2.05	1.03	4.51E-05	0.000320322
EFAL004_02197	hypothetical protein	KX	Transcription; Defense mechanisms	2211643	2222156	357.02	147.36	566.69	3.85	1.94	3.76E-12	6.85E-11
EFAL004_04810	hypothetical protein	KJ	Transcription; Translation; ribosomal structure and biogenesis	2699994	2670517	9063.02	5996.57	12129.47	2.02	1.02	5.79E-09	6.26E-08
EFAL004_00003	S4 domain protein, YaaA	J	Translation; ribosomal structure and biogenesis	2925	3154	275.00	153.47	396.13	2.59	1.38	7.14E-08	6.20E-07
EFAL004_00075	16S rRNA small subunit methyltransferase C	J	Translation; ribosomal structure and biogenesis	77226	77832	102.57	54.52	150.62	2.79	1.47	9.13E-06	5.29E-05
EFAL004_00138	peptide deformylase	J	Translation; ribosomal structure and biogenesis	180003	180567	1637.37	1717.75	3356.89	2.67	1.05	1.72E-08	1.71E-07
EFAL004_00663	putative ATPase or kinase	J	Translation; ribosomal structure and biogenesis	682954	683426	41.33	25.55	57.12	2.24	1.16	0.010488893	0.049623012
EFAL004_00698	S05 ribosomal protein L31	J	Translation; ribosomal structure and biogenesis	732113	732377	2233.57	1019.96	3447.18	3.38	1.76	1.21E-10	5.89E-10
EFAL004_01239	translation elongation factor Tu	J	Translation; ribosomal structure and biogenesis	1264976	1266261	7029.66	4249.55	9789.78	2.30	1.20	7.14E-12	1.24E-10
EFAL004_01256	acetyltransferase, GNAT family	J	Translation; ribosomal structure and biogenesis	1300528	1300563	102.79	57.85	140.73	2.50	1.37	0.000124329	0.000585685
EFAL004_01343	23S rRNA (uracil-5)-methyltransferase	J	Translation; ribosomal structure and biogenesis	1989886	1991269	535.27	339.26	742.29	2.76	1.18	7.15E-08	2.11E-07
EFAL004_01711	dRNA pseudouridine synthase B	J	Translation; ribosomal structure and biogenesis	1734341	1735365	135.85	51.89	219.77	4.23	2.08	8.52E-11	5.47E-10
EFAL004_01740	ribosomal-protein-alarine acetyltransferase	J	Translation; ribosomal structure and biogenesis	1768601	1769044	366.37	212.81	517.02	2.43	1.28	2.87E-08	2.70E-07
EFAL004_01741	universal bacterial protein hsaZ	J	Translation; ribosomal structure and biogenesis	1769277	1769852	679.53	375.26	985.28	2.64	1.40	3.80E-05	0.000199557
EFAL004_01939	RNA methyltransferase	J	Translation; ribosomal structure and biogenesis	1964194	1964959	128.87	78.58	175.15	2.28	1.19	0.000279366	0.000207929
EFAL004_02051	acetyltransferase, GNAT family	J	Translation; ribosomal structure and biogenesis	2079325	2079894	52.79	34.06	71.52	2.10	1.07	0.015463081	0.042199326
EFAL004_02744	Ribonuclease I7	J	Translation; ribosomal structure and biogenesis	2277105	2278265	4518.26	2756.40	6760.11	3.00	1.59	1.84E-17	6.61E-16
EFAL004_02935	acetyltransferase	J	Translation; ribosomal structure and biogenesis	2341582	2341831	48.28	13.70	82.86	6.05	2.60	7.83E-08	6.64E-07
EFAL004_02936	acetyltransferase	J	Translation; ribosomal structure and biogenesis	2341821	2342562	23.29	9.91	36.46	3.70	1.89	0.0003804267	0.008461598
EFAL004_02459	S05 ribosomal protein L33	J	Translation; ribosomal structure and biogenesis	2476344	2476497	12.86	2.68	15.63	8.59	3.10	0.000239562	0.008461598
EFAL004_02767	S05 ribosomal protein L32	J	Translation; ribosomal structure and biogenesis	2812713	2813263	113.34	74.51	152.16	2.04	1.03	0.0016771015	0.006986937

Table S3C. Genes whose transcript levels have decreased during growth with caspofungin (8 µg/mL) compared to control condition (no antifungal agent)

Gene ID	Product	COG code	COG functional category	Start	End	baseMean	baseMean	baseMean	foldChange	log2(foldChange)	pval	padj
EAL004_02352	KL3 family transposase	X	Mobilome: prophages, transposons	1402770	1424420	61.26	84.05	38.47	2.18	-1.23	0.00377126	0.01543039
EAL004_02708	EEA7, transposase	X	Mobilome: prophages, transposons	2770260	2772415	56.74	91.08	22.40	4.07	-2.02	7.64E-05	0.00335226
EAL004_04136	peptide ABC transporter permease/transmembrane protein	V	Defense mechanisms	445550	445366	5396.21	7226.60	3446.02	-2.13	-1.09	6.14E-09	6.96E-08
EAL004_06115	proteasome translocase subunit SctA	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	126653	107949	5472.40	9325.01	3629.26	-2.57	-1.36	1.71E-09	2.01E-08
EAL004_09038	Ribazole/methylotetra-nucleoside domain protein	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	235399	235204	3621.57	5376.51	1836.62	-2.94	-1.56	1.83E-06	1.21E-05
EAL004_09187	signal recognition particle protein	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	1900120	1901598	433.75	544.18	248.22	-2.07	-1.05	1.45E-06	6.79E-06
EAL004_09794	hypothetical protein	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	2847584	2848733	59.85	65.04	36.62	-2.27	-1.28	0.00512840	0.02549953
EAL004_09940	transcriptional regulator, AraC family	TK	Signal transduction mechanisms: Transcription	2949510	2948993	143.75	510.04	243.26	-2.15	-1.20	1.08E-06	7.21E-06
EAL004_09949	dihydroxypropane kinase, phosphotransfer substrate	T	Signal transduction mechanisms	395520	395528	908.44	1628.09	308.99	-5.27	-2.80	1.48E-11	1.87E-29
EAL004_09959	histidine kinase	T	Signal transduction mechanisms	671154	531851	27.75	95.24	16.21	-4.47	-2.28	0.01307495	0.05173948
EAL004_09959	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	758434	768279	411.05	552.51	249.49	-2.05	-1.04	1.73E-06	1.16E-05
EAL004_09958	universal stress protein UspA	T	Signal transduction mechanisms	1079410	1079445	547.94	798.46	293.41	-2.68	-1.42	6.63E-12	1.45E-10
EAL004_09959	putative lipase/esterase	T	Signal transduction mechanisms	1188930	1189264	5925.50	9342.72	3806.28	-3.22	-1.69	2.07E-20	1.12E-18
EAL004_09959	universal stress protein	T	Signal transduction mechanisms	1208807	1204248	50043.65	162163.11	17094.24	-5.25	-3.38	3.27E-45	2.93E-42
EAL004_09959	sensor histidine kinase	T	Signal transduction mechanisms	1401266	1402334	1305.84	1774.87	835.61	-2.12	-1.08	7.81E-08	6.64E-07
EAL004_09959	metallochalcogenase	T	Signal transduction mechanisms	1574842	1575372	2694.64	3875.93	1853.34	-2.29	-1.06	1.90E-08	1.88E-07
EAL004_09959	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	1589673	1594357	91.71	153.01	38.41	-3.38	-1.59	3.44E-09	3.85E-08
EAL004_09959	membrane protein	T	Signal transduction mechanisms	2297490	2297940	22247.83	35426.25	11007.51	-3.03	-1.60	6.11E-08	5.43E-07
EAL004_09959	sensor histidine kinase	T	Signal transduction mechanisms	2482080	2482925	156.88	240.01	113.76	-2.56	-1.36	1.02E-05	5.83E-05
EAL004_09959	myosin cross-reactive antigen like protein	S	Function unknown	328916	330511	5708.49	7955.41	3625.57	-2.29	-1.23	1.70E-10	2.24E-09
EAL004_09959	UPK1C motif protein cell wall anchor domain protein	S	Function unknown	527436	528104	21.85	36.30	11.55	-3.13	-1.64	0.00731042	0.02174423
EAL004_09959	hypothetical protein	S	Function unknown	1038800	1037235	2933.34	4852.24	1714.45	-2.39	-1.26	2.01E-11	3.24E-10
EAL004_09959	alpha beta5 integrin-binding family protein	S	Function unknown	1048025	1048620	6406.12	11035.03	1777.21	-6.21	-2.63	1.83E-45	8.20E-43
EAL004_09959	hypothetical protein	S	Function unknown	1075706	1076105	721.35	1120.90	343.80	-3.28	-1.71	5.75E-08	5.17E-07
EAL004_09959	hypothetical protein	S	Function unknown	1076920	1077222	1136.61	1769.63	631.59	-2.79	-1.48	6.13E-14	1.43E-12
EAL004_09959	SPH domain / Sord7 family protein	S	Function unknown	1162802	1161482	18990.07	30776.41	7253.79	-4.51	-2.27	2.88E-33	4.67E-31
EAL004_09959	membrane protein	S	Function unknown	1402310	1410963	822.63	1363.89	443.40	-2.52	-1.33	1.12E-11	1.87E-10
EAL004_09959	hypothetical protein	S	Function unknown	1498948	1500121	6348.96	9436.25	3275.85	-2.90	-1.53	1.43E-08	1.42E-07
EAL004_09959	hypothetical protein	S	Function unknown	1501214	1510413	289.97	394.75	145.18	-2.77	-1.44	0.00445952	0.02182793
EAL004_09959	hypothetical protein	S	Function unknown	2055754	2057423	18209.40	29685.63	11494.18	-2.18	-1.13	7.09E-10	7.83E-09
EAL004_09959	hypothetical protein	S	Function unknown	2952086	2952425	69.32	105.70	31.94	-3.21	-1.68	0.01335700	0.05042613
EAL004_09959	ABC transporter ATP-binding protein	R	General function prediction only	83084	84647	175.33	239.01	111.65	-2.14	-1.20	6.13E-05	0.00231524
EAL004_09959	ABC transporter permease protein	R	General function prediction only	83771	85729	264.65	365.56	183.24	-2.23	-1.26	7.09E-06	4.16E-05
EAL004_09959	oxidoreductase, alcohol dehydrogenase family protein	R	General function prediction only	318752	319742	7730.08	12421.85	5299.31	-6.29	-2.68	7.79E-47	5.13E-44
EAL004_09959	dihydroxyacetone kinase, DHA subunit	R	General function prediction only	398790	397578	377.99	614.99	141.99	-4.36	-2.23	1.37E-20	7.53E-19
EAL004_09959	putative lysine decarboxylase	R	General function prediction only	620497	620223	50.35	67.30	33.40	-2.21	-1.01	0.02258347	0.07392595
EAL004_09959	oxidoreductase family, NAD-binding Rossmann fold protein	R	General function prediction only	804137	815101	9495.78	14936.58	5202.58	-2.29	-1.06	2.87E-09	3.33E-08
EAL004_09959	glyoxalase family protein	R	General function prediction only	1214653	1215054	126.18	182.91	180.45	-2.25	-1.25	2.97E-09	2.41E-08
EAL004_09959	chitin-binding protein	R	General function prediction only	1391442	1330022	2706.12	4808.45	723.78	-6.64	-2.73	3.38E-46	5.95E-43
EAL004_09959	Trihydroxyalase associated protein	R	General function prediction only	1499335	1499378	1462.52	2165.34	717.69	-3.01	-1.59	1.78E-13	3.97E-12
EAL004_09959	hypothetical protein	R	General function prediction only	1895655	1897357	1864.63	3051.89	676.28	-4.51	-2.27	3.12E-19	1.41E-17
EAL004_09959	oxidoreductase family, NAD-binding Rossmann fold protein	R	General function prediction only	2895900	2891528	18.10	36.94	9.27	-2.91	-1.54	0.00379125	0.01632038
EAL004_09959	glyoxalase family protein	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	352329	362581	639.80	915.42	334.18	-2.82	-1.50	2.83E-12	5.25E-11
EAL004_09959	ketonolysin resistance protein FcII domain protein	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	1175030	1175373	155.71	220.49	90.92	-2.43	-1.28	5.81E-06	3.48E-05
EAL004_09959	Manganese containing catalase	P	Inorganic ion transport and metabolism	538304	527155	1678.52	2486.92	870.11	-2.86	-1.52	3.97E-15	1.05E-13
EAL004_09959	magnesium-translocating P-type ATPase	P	Inorganic ion transport and metabolism	647154	649513	1473.08	1570.03	975.13	-2.07	-1.01	0.0005398	0.01115287
EAL004_09959	Mg ²⁺ -cation transporter	P	Inorganic ion transport and metabolism	1501996	1511943	4908.09	8095.07	3517.31	-4.44	-2.25	3.68E-11	6.19E-29
EAL004_09959	ATP-dependent protease HcVII, A1/Pow subunit	D	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	1265715	1270636	7630.68	11249.83	5101.94	-2.25	-1.13	2.49E-05	0.00319632
EAL004_09959	SsaA-binding protein	D	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	2089167	2089852	734.08	958.90	448.25	-2.14	-1.10	5.69E-08	5.16E-07
EAL004_09959	peptidase, U21 family	D	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	2925504	2926753	361.64	484.60	238.67	-2.03	-1.02	1.32E-05	7.40E-05
EAL004_09959	Basic membrane lipoprotein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	81750	82873	674.83	956.96	392.70	-2.44	-1.29	8.59E-10	1.06E-08
EAL004_09959	glycine betaine/L-carnitine/cholone ABC transporter	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	227255	228183	1027.64	1523.63	591.64	-2.87	-1.52	1.49E-14	3.69E-13
EAL004_09959	hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	350122	351170	129.74	162.36	57.12	-2.84	-1.51	3.09E-06	1.97E-05
EAL004_09959	LysM domain protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	529549	530158	1136.16	1546.01	622.52	-2.63	-1.29	4.84E-08	4.40E-07
EAL004_09959	peptidoglycan-binding protein LysM	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	1080775	1080838	473.23	655.64	280.74	-2.37	-1.25	0.02012534	0.02519313
EAL004_09959	LysM domain-containing protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	1177212	1177753	346.65	487.20	205.29	-2.36	-1.24	0.01432028	0.02039075
EAL004_09959	6PP4-4-dehydroanthraquinone reductase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	1440470	1441322	527.51	721.81	333.21	-2.17	-1.07	0.00098985	0.02373751
EAL004_09959	glyoxyl/trandoxone family delta	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	1503353	1504256	7734.72	12907.49	2561.96	-5.04	-2.23	1.29E-36	3.44E-34
EAL004_09959	glyoxyl/trandoxone family delta	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	1504242	1505106	11628.83	17426.06	3529.81	-2.99	-1.58	3.70E-18	1.44E-16
EAL004_09959	Protoporphyrin IX:glyoxyl/trandoxone	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2052837	2053668	1056.63	1471.53	681.74	-2.10	-1.07	3.95E-08	3.71E-07

EFAL004_00333	penicillin-binding protein_3A family	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	258579	258743	1531.24	1805.40	897.39	-2.01	-1.01	1.15E-07	9.49E-07
EFAL004_00480	DNA-directed DNA polymerase	L	Replication, recombination and repair	434448	456232	1270.56	1026.07	757.25	-2.41	-1.27	7.55E-11	1.11E-09
EFAL004_00661	uvrA1 DNA glycosylase	L	Replication, recombination and repair	679028	679599	669.65	322.87	452.22	-2.03	-1.02	3.54E-07	2.62E-06
EFAL004_02150	DNA topoisomerase II	L	Replication, recombination and repair	863620	2837232	215.54	40.46	16.72	-2.41	-1.27	0.01733807	0.15048999
EFAL004_00354	PTS system, aspartate-specific IIA component	K	Transcription	351435	355529	18.99	95.39	20.19	-2.06	-1.07	0.00553104	0.00244039
EFAL004_00370	MarR family transcriptional regulator	K	Transcription	179388	174273	1803.87	1575.75	1525.98	-2.51	-1.33	6.55E-13	1.33E-11
EFAL004_00375	BglG family transcriptional antiterminator	K	Transcription	591931	596799	1656.93	1516.65	1329.71	-2.32	-1.21	1.43E-10	1.97E-09
EFAL004_00395	BglG family transcriptional antiterminator	K	Transcription	625428	626218	392.25	641.57	142.53	-4.49	-2.17	1.33E-11	1.33E-10
EFAL004_00611	Lac family sugar-binding transcriptional regulator	K	Transcription	636006	636738	637.65	1168.23	215.63	-5.17	-2.37	1.40E-10	4.37E-07
EFAL004_00697	PTS system, aspartate-specific IIA component	K	Transcription	954555	956571	1325.28	2450.09	185.68	-2.89	-1.50	2.57E-11	3.45E-08
EFAL004_01175	GTP sensing transcriptional pleiotropic repressor CofII	K	Transcription	1209406	1205128	6642.23	12825.24	6535.32	-2.33	-1.50	4.47E-14	1.09E-12
EFAL004_01261	transcriptional antiterminator bglG	K	Transcription	1290125	1298878	1070.52	1352.13	588.84	-2.61	-1.40	1.79E-09	2.10E-08
EFAL004_01742	transcriptional regulator, LacI family	K	Transcription	1769540	1770921	1138.21	1718.06	858.37	-2.20	-1.00	4.95E-06	3.04E-05
EFAL004_01939	DNA-binding protein	K	Transcription	1901591	1910388	116.95	159.77	74.13	-2.16	-1.11	0.00394790	0.10168813
EFAL004_02152	helicium-helic protein	K	Transcription	2184711	2194938	1585.08	1917.79	652.36	-2.25	-1.17	4.30E-10	5.75E-09
EFAL004_02235	transcriptional regulator, Fts family	K	Transcription	2261832	2262691	1536.64	1120.47	993.22	-2.13	-1.09	4.24E-09	4.67E-08
EFAL004_02293	transcriptional antiterminator bglG/Sigma 54 factor	K	Transcription	2289112	2292687	266.25	412.54	115.56	-3.44	-1.78	4.83E-11	7.33E-10
EFAL004_02594	transcriptional regulator, AraC family	K	Transcription	2579613	2579622	411.06	524.72	177.40	-3.52	-1.82	1.43E-15	1.38E-14
EFAL004_02791	Helix-turn-helix domain protein	K	Transcription	2849460	2849637	638.61	637.26	399.23	-2.20	-1.07	1.99E-07	1.49E-06
EFAL004_00089	elongation factor Tu	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	55751	96939	15215.41	23362.78	10091.04	-2.03	-1.02	0.00682396	0.00712144
EFAL004_00096	S16 ribosomal protein L4	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	98341	98965	1040.63	1951.18	690.29	-2.02	-1.01	0.00218986	0.00684244
EFAL004_00097	S16 ribosomal protein L23	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	98984	99255	786.05	1074.98	457.12	-2.35	-1.23	0.00758052	0.00891628
EFAL004_00102	S16 ribosomal protein L16	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	121430	101525	855.55	1216.71	554.40	-2.19	-1.13	0.00201362	0.01089254
EFAL004_00104	S16 ribosomal protein S17	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	102127	102294	530.67	719.41	342.04	-2.11	-1.08	0.00075620	0.00256209
EFAL004_00106	S16 ribosomal protein L24	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	102856	103165	582.27	800.32	364.22	-2.20	-1.14	0.00888342	0.02152807
EFAL004_00107	S16 ribosomal protein L5	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	103152	103762	1095.71	1529.11	672.20	-2.26	-1.18	3.08E-05	0.00630815
EFAL004_00108	S16 ribosomal protein S14	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	103750	103936	580.33	827.59	353.07	-2.34	-1.23	3.12E-06	2.00E-05
EFAL004_00110	S16 ribosomal protein L6	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	124471	104838	2835.16	3854.93	1855.40	-2.29	-1.16	0.00041556	0.01753817
EFAL004_00111	S16 ribosomal protein L18	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	125098	105455	1908.75	2818.53	998.98	-2.82	-1.50	0.00024716	0.01105491
EFAL004_00113	S16 ribosomal protein L30	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	125590	106170	257.36	432.88	151.64	-2.57	-1.42	0.00202754	0.00505701
EFAL004_00114	S16 ribosomal protein L15	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	136215	106524	1526.58	2056.82	1041.14	-2.01	-1.01	0.01120568	0.01319273
EFAL004_00119	S16 ribosomal protein S13	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	139232	109299	983.25	1208.41	645.10	-2.04	-1.03	5.31E-07	3.81E-06
EFAL004_00125	S16 ribosomal protein L26	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	245193	244792	363.48	804.36	363.27	-2.11	-1.08	6.91E-07	4.85E-06
EFAL004_00126	S16 ribosomal protein L20	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	254944	265204	1642.29	2264.99	999.60	-2.27	-1.18	4.41E-10	5.79E-09
EFAL004_00329	azacyltransferase, GNAT family	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	336136	326631	38.60	55.35	22.09	-2.51	-1.33	0.0171809	0.0454002
EFAL004_00384	amidase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	930708	908350	289.29	382.10	156.49	-2.44	-1.29	4.77E-08	4.38E-07
EFAL004_01430	mRNA (5'-terminal) methyltransferase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	1885123	1895885	927.77	1244.65	580.20	-2.44	-1.28	1.02E-11	4.71E-10
EFAL004_01497	11S rRNA processing protein RimM	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	1895874	1896336	373.41	568.37	238.45	-2.13	-1.09	1.22E-05	6.27E-06
EFAL004_01932	hypothetical protein	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	1956837	1957956	20544.24	20352.60	12719.87	-2.23	-1.16	2.75E-11	4.35E-10
EFAL004_02128	GTP binding protein HKM	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2212740	2211979	1006.67	1671.39	713.35	-2.24	-1.13	1.50E-08	3.34E-07
EFAL004_02129	mRNA dimethylallyltransferase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2218902	2217488	669.99	916.80	408.69	-2.27	-1.18	1.86E-08	1.99E-07
EFAL004_02462	diacylglycerol kinase catalytic subunit	M	Lipid transport and metabolism; General function prediction only	2479458	2479424	1586.27	2269.40	907.14	-2.50	-1.32	1.67E-12	1.16E-11
EFAL004_01478	oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family protein	M	Lipid transport and metabolism; Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; General function prediction only	1501177	1501921	6533.34	11095.75	7000.92	-5.53	-2.47	1.69E-17	1.24E-10
EFAL004_00777	D-xylose-5-phosphate/oxalobialate ligase subunit 2	M	Lipid transport and metabolism; Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	761034	761368	327.07	410.93	213.23	-2.02	-1.02	3.45E-05	0.00182969
EFAL004_00345	Malonyl-CoA:acyl carrier protein transacylase	I	Lipid transport and metabolism	344948	345761	103.87	210.02	57.08	-5.44	-2.44	2.52E-18	1.04E-16
EFAL004_00346	malonate decarboxylase, alpha subunit	I	Lipid transport and metabolism	347707	347824	229.27	442.92	75.62	-5.06	-2.25	7.48E-24	5.75E-22
EFAL004_00348	malonate decarboxylase, beta subunit	I	Lipid transport and metabolism	347824	349481	315.37	492.81	137.54	-3.57	-1.84	3.90E-15	1.04E-13
EFAL004_02004	NADH oxidase	I	Lipid transport and metabolism	1012435	1005808	29996.11	68871.29	15115.63	-2.90	-1.54	3.58E-18	1.37E-16
EFAL004_01317	acetyl-CoA carboxylase, beta subunit	I	Lipid transport and metabolism	1364030	1365400	2177.34	2918.01	1456.27	-2.03	-1.02	1.08E-07	1.61E-06
EFAL004_01318	(R)-hydroxypropyl-(acyl) carrier protein	I	Lipid transport and metabolism	1365407	1365837	1046.62	1484.55	648.69	-2.23	-1.16	1.38E-08	1.41E-07
EFAL004_02130	glycerophosphodiester phosphoglycerase family protein	I	Lipid transport and metabolism	2214801	2215699	847.49	1216.16	368.83	-2.90	-1.45	1.78E-10	1.69E-08
EFAL004_02265	PP2 family protein	I	Lipid transport and metabolism	2635130	2635795	47.82	67.29	26.26	-2.26	-1.25	0.00500382	0.01600492
EFAL004_00215	ABC family protein	M	Coenzyme transport and metabolism; Signal transduction mechanisms	238676	238622	3540.57	4325.85	2173.23	-2.27	-1.18	1.47E-10	2.06E-09
EFAL004_01252	4-phospho-2-oxoglutarate dehydrogenase	M	Coenzyme transport and metabolism; General function prediction only	1359485	1338434	10539.36	14022.78	5328.18	-2.87	-1.52	4.07E-11	6.25E-10
EFAL004_01219	acetyl-CoA carboxylase, beta subunit	M	Coenzyme transport and metabolism; Lipid transport and metabolism	1363861	1366338	661.58	947.56	422.60	-2.25	-1.17	2.76E-07	2.07E-06
EFAL004_01541	hypothetical protein	M	Coenzyme transport and metabolism	1558012	1556190	660.67	970.36	352.78	-2.77	-1.47	1.05E-12	1.04E-11
EFAL004_02101	Fatty polyketide synthase	M	Coenzyme transport and metabolism	2255830	2237144	5783.29	7785.10	3761.08	-2.26	-1.04	1.20E-08	1.23E-07
EFAL004_01645	consporene/lanosene-inducible gamma-GluG protein	M	Coenzyme transport and metabolism	2200919	2201021	348.94	498.00	199.87	-2.49	-1.32	9.67E-09	1.03E-07
EFAL004_01658	PTS system, fructose-specific IAB component	GT	Carbohydrate transport and metabolism; Signal transduction mechanisms	1675214	1676186	1473.75	1059.34	886.76	-2.32	-1.22	1.68E-07	1.33E-06
EFAL004_01651	PTS system, fructose-specific IIA component	GT	Carbohydrate transport and metabolism; Signal transduction mechanisms	1575446	1575425	15.94	24.25	7.63	-3.18	-1.67	0.04820336	0.08332104
EFAL004_00039	6-phospho-beta-galactosidase	G	Carbohydrate transport and metabolism	38760	42162	127.39	207.30	48.07	-2.33	-1.21	1.59E-12	3.61E-11
EFAL004_00084	phenolacetate lyase	G	Carbohydrate transport and metabolism	66827	87994	528.89	768.24	287.53	-2.27	-1.42	2.13E-10	2.87E-09

EAL004_0010	glyceral uptake facilitator protein	G	Carbohydrate transport and metabolism	155130	155865	347.60	465.46	235.24	-0.23	-1.02	0.005880195	0.15440397
EAL004_0019	PTS system, triose kinase/fructose specific, IIBA component	G	Carbohydrate transport and metabolism	171720	171879	283.34	464.49	120.28	-4.55	-2.38	1.75119	1.68617
EAL004_0024	PTS system, lactose/raffinose-specific IC component	G	Carbohydrate transport and metabolism	320853	322195	321.25	475.75	165.73	-2.85	-1.51	1.57607	1.25606
EAL004_0025	beta-glucosidase	G	Carbohydrate transport and metabolism	322211	323077	357.97	600.09	115.85	-5.18	-2.87	2.68524	2.17632
EAL004_0037	glucan 1,6-alpha-glucosidase	G	Carbohydrate transport and metabolism	354700	366333	280.00	503.14	52.45	-0.71	-3.28	2.25129	3.20627
EAL004_0038	PTS system, beta-glucoside-specific IABC component	G	Carbohydrate transport and metabolism	359575	371501	299.92	468.17	70.67	-5.79	-2.53	4.10613	5.81512
EAL004_0039	glyceral uptake facilitator protein	G	Carbohydrate transport and metabolism	361728	363453	35.38	96.34	12.42	-5.37	-2.43	5.13607	3.70806
EAL004_0039	dihydroxyacetone kinase, DhaK subunit	G	Carbohydrate transport and metabolism	392932	393943	147.65	134.07	251.23	-4.35	-0.21	1.23628	1.38626
EAL004_0040	PTS system, beta-glucoside specific IABC component	G	Carbohydrate transport and metabolism	493286	495010	66.36	97.29	33.42	-2.61	-1.54	6.10645	0.0038916
EAL004_0041	D-fructose pyruvate	G	Carbohydrate transport and metabolism	496029	491205	75.01	117.20	36.73	-3.10	-1.67	1.33605	0.92506
EAL004_0049	glucokinase	G	Carbohydrate transport and metabolism	496157	497375	1507.97	1758.77	453.17	-5.98	-2.58	9.42814	2.17612
EAL004_0049	aldose 1-epimerase	G	Carbohydrate transport and metabolism	497361	498413	838.21	1290.57	326.26	-3.36	1.58	5.12622	3.04620
EAL004_0050	phosphoglucomutase (phosphomannomutase family) protein	G	Carbohydrate transport and metabolism	516023	517566	1715.63	2029.95	811.23	-3.23	-1.69	1.22817	4.48616
EAL004_0051	putative 6-phosphate-beta-glucosidase	G	Carbohydrate transport and metabolism	606969	617867	872.47	1315.50	426.95	-3.26	-1.62	1.89816	6.12615
EAL004_0054	PTS system, sugar-specific IC component	G	Carbohydrate transport and metabolism	623258	625333	238.02	317.76	158.26	-2.01	-1.01	5.53645	0.00281255
EAL004_0057	PTS system, mannose/fructose/raffinose-specific IA component	G	Carbohydrate transport and metabolism	732458	733891	68.28	107.75	28.81	-8.74	-1.50	8.73647	6.04666
EAL004_0076	PTS system, mannose/fructose/raffinose-specific IB component	G	Carbohydrate transport and metabolism	738932	739797	138.17	214.00	22.33	-0.58	-2.26	3.84623	2.65621
EAL004_0079	PTS system, mannose/fructose/raffinose-specific IC component	G	Carbohydrate transport and metabolism	754417	755277	64.75	115.81	12.65	-0.73	-2.21	4.84848	4.40547
EAL004_0080	PTS system, mannose/fructose/raffinose-specific ID component	G	Carbohydrate transport and metabolism	760223	771245	47.35	76.37	39.02	-4.10	-2.00	0.00394867	0.17318236
EAL004_0070	PTS system, fructose-specific IC component	G	Carbohydrate transport and metabolism	732327	734746	15.35	24.60	7.97	-3.11	-1.64	0.0204339	0.174133363
EAL004_0073	PTS system, mannose/fructose/raffinose-specific IB component	G	Carbohydrate transport and metabolism	777875	778367	431.25	605.17	2271.52	-2.68	-1.42	2.11813	4.65612
EAL004_0074	PTS system, mannose/fructose/raffinose-specific IAB component	G	Carbohydrate transport and metabolism	778429	779459	25201.56	40921.24	6203.38	-7.50	-2.51	1.83627	2.04625
EAL004_0075	PTS system, mannose/fructose/raffinose-specific IC component	G	Carbohydrate transport and metabolism	779451	780295	10841.98	19376.54	3307.40	-8.40	-3.07	1.52623	1.10621
EAL004_0076	PTS system, mannose/fructose/raffinose-specific ID component	G	Carbohydrate transport and metabolism	780153	781230	14382.04	22923.58	3443.30	-4.21	-2.07	6.16811	9.79629
EAL004_0082	N-acetylmannosamine 6-phosphate 2-epimerase	G	Carbohydrate transport and metabolism	875126	875310	151.89	299.54	84.23	-3.56	-1.63	5.82612	1.02510
EAL004_0087	mannuronate dehydratase	G	Carbohydrate transport and metabolism	889132	889314	40.56	55.63	25.50	-2.18	-1.13	0.00597638	0.127532827
EAL004_0087	bacterial extracellular solute-binding protein	G	Carbohydrate transport and metabolism	893332	900392	122.85	221.32	22.40	-0.88	-3.20	1.64623	1.15621
EAL004_0098	PTS system, ascorbate-specific IB component	G	Carbohydrate transport and metabolism	956972	956987	60.43	103.01	17.85	-5.77	-2.53	3.54645	0.00203795
EAL004_0099	PTS system, ascorbate specific IC component	G	Carbohydrate transport and metabolism	956862	958254	337.83	543.48	132.18	-4.11	-2.04	0.00208275	0.03943946
EAL004_0106	phosphoglycerate mutase family protein	G	Carbohydrate transport and metabolism	1002912	1008827	1514.33	1265.83	862.93	-0.25	-1.03	1.42847	1.18646
EAL004_01125	lysostrophalin	G	Carbohydrate transport and metabolism	1155091	1159778	5111.26	8974.69	3494.09	-2.45	-1.00	4.07610	4.93749
EAL004_01174	aldose 1-epimerase	G	Carbohydrate transport and metabolism	120340	123432	3738.38	5266.05	2451.92	-2.07	-1.05	1.11645	6.30645
EAL004_01251	PTS system, arabinose/raffinose-specific IC component	G	Carbohydrate transport and metabolism	126878	128719	171.72	309.06	40.39	-7.50	-2.61	1.52623	1.10621
EAL004_01257	PTS system, galactitol specific IC component	G	Carbohydrate transport and metabolism	128147	129229	175.75	245.48	136.20	-2.32	-1.21	5.32646	3.22645
EAL004_01278	PTS system, IC component	G	Carbohydrate transport and metabolism	1311891	1313293	81.14	110.99	53.30	-2.16	-4.11	0.00384975	0.06313872
EAL004_01372	bacterial extracellular solute binding protein	G	Carbohydrate transport and metabolism	158413	158700	23.50	44.29	14.20	-3.15	-1.86	0.01786438	0.28919425
EAL004_01740	galactose 1-phosphate uridylyltransferase	G	Carbohydrate transport and metabolism	1773544	1777429	3101.56	4380.71	1822.41	-2.40	-1.27	5.02612	1.90611
EAL004_01913	PTS system, mannose/fructose/raffinose-specific ID component	G	Carbohydrate transport and metabolism	1967312	1968122	22.69	40.45	1.93	-8.20	-3.04	4.06846	2.53645
EAL004_01944	PTS system, mannose/fructose/raffinose-specific IC component	G	Carbohydrate transport and metabolism	1968218	1968295	36.91	63.50	10.32	-6.15	-2.62	1.73647	1.40646
EAL004_01945	PTS system, mannose/fructose/raffinose-specific IB component	G	Carbohydrate transport and metabolism	1968211	1968421	25.69	42.32	9.37	-4.54	-3.18	0.00276037	0.00793845
EAL004_01946	tagatase 5-phosphatase kinase	G	Carbohydrate transport and metabolism	1968466	1970628	1.83	33.88	3.96	-8.58	-3.00	2.99405	0.002034787
EAL004_01947	tagatase 1,6-diphosphate aldolase	G	Carbohydrate transport and metabolism	1970664	1971620	43.31	57.26	28.85	-2.00	-1.00	0.015544773	0.04124861
EAL004_02094	PTS system, cellobiose-specific IB component	G	Carbohydrate transport and metabolism	2074939	2075214	527.00	746.28	247.72	-3.29	-1.63	1.13613	2.57612
EAL004_02330	L-arabinose isomerase	G	Carbohydrate transport and metabolism	2375181	2377626	13.93	23.66	6.32	-3.42	-1.78	0.01800436	0.173634678
EAL004_02341	carboxylate kinase, GG7 family protein	G	Carbohydrate transport and metabolism	2379276	2379938	31.21	95.08	9.34	-5.30	-3.56	3.94646	2.47645
EAL004_02347	Alternate hydrolase	G	Carbohydrate transport and metabolism	2578562	2580025	47.62	65.44	25.79	-2.20	1.24	0.0083361	0.122533888
EAL004_02348	glucuronate isomerase	G	Carbohydrate transport and metabolism	2580347	2581442	139.41	161.99	76.83	-2.11	-1.08	0.00471592	0.01551077
EAL004_02350	AP endonuclease	G	Carbohydrate transport and metabolism	2582245	2583122	68.36	103.86	32.86	-3.16	-1.66	1.89645	0.002070182
EAL004_02354	ABC transporter permease	G	Carbohydrate transport and metabolism	2602172	2624094	24.20	37.77	10.64	-3.55	-1.83	0.002139085	0.00770818
EAL004_02365	ABC transporter permease	G	Carbohydrate transport and metabolism	2604185	2630953	35.90	60.59	30.82	-5.64	-2.49	0.010266025	0.126991148
EAL004_02371	PTS system, cellobiose-specific IA component	G	Carbohydrate transport and metabolism	2612283	2612628	153.91	210.51	57.30	-2.16	-1.11	0.00363814	0.121171719
EAL004_02376	PTS system, mannose/fructose/raffinose-specific IA component	G	Carbohydrate transport and metabolism	2768325	2789748	387.38	565.16	109.61	-2.70	-1.43	0.002339185	0.007330274
EAL004_00018	adenylsuccinate synthetase	F	Nucleotide transport and metabolism	1785	18678	985.23	1494.02	474.43	-3.15	1.86	2.81117	9.99616
EAL004_00077	pyrimidine-nucleoside phosphorylase	F	Nucleotide transport and metabolism	78294	80788	321.34	467.54	175.14	-2.57	-1.42	6.85210	6.62649
EAL004_00078	deoxyribose-phosphate ribotase	F	Nucleotide transport and metabolism	88913	81296	285.05	152.23	113.87	-3.76	-1.51	2.42815	6.71614
EAL004_00079	cytidine deaminase	F	Nucleotide transport and metabolism	81326	81175	67.01	30.25	43.77	-2.26	-1.64	0.00202164	0.11107253
EAL004_00085	purine nucleoside phosphorylase	F	Nucleotide transport and metabolism	88237	88836	175.56	253.68	100.44	-2.50	-1.32	2.82646	1.84645
EAL004_00086	purine nucleoside phosphorylase	F	Nucleotide transport and metabolism	88852	83562	143.49	202.35	84.83	-2.29	1.26	1.57645	8.72645
EAL004_00116	adenylate kinase	F	Nucleotide transport and metabolism	128010	130358	945.04	1345.33	544.83	-2.47	-1.30	6.83210	6.81649
EAL004_00090	guanilate kinase	F	Nucleotide transport and metabolism	912494	923183	31.49	43.32	19.66	-2.20	-1.34	0.018089561	0.004949193
EAL004_00070	inosine-uridine-preferring nucleoside hydrolase	F	Nucleotide transport and metabolism	2035207	2036652	758.41	1070.32	536.50	-2.11	-1.08	1.13845	7.40645
EAL004_00089	bacterial extracellular solute-binding protein, family 3	EF	Amino acid transport and metabolism; Signal transduction mechanisms	938350	939387	234.08	338.26	52.06	-3.65	-1.87	1.78613	1.97612

EFAL004_0005	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	E	Amino acid transport and metabolism; General function prediction only	2892394	2891452	15.86	25.28	6.64	-3.78	-1.92	0.00728875	0.212388232
EFAL004_00138	bacterial extracellular solute-binding protein, family 5	E	Amino acid transport and metabolism	128440	130421	1000.14	1988.02	602.25	-2.31	-1.21	6.81E-10	6.61E-09
EFAL004_00030	ABC transporter, permease protein	E	Amino acid transport and metabolism	226357	227269	2274.47	3356.02	1192.52	-2.81	-1.49	8.01E-16	2.40E-14
EFAL004_00403	amino acid permease	E	Amino acid transport and metabolism	430330	403902	1554.22	2250.00	877.53	-2.57	-1.26	3.52E-12	6.41E-11
EFAL004_00463	cystathionine gamma-lyase	E	Amino acid transport and metabolism	478076	479322	761.29	1093.17	385.21	-2.81	-1.69	0.013684182	0.256318991
EFAL004_00896	amino acid ABC transporter, amino acid-binding/permease	E	Amino acid transport and metabolism	939166	938248	182.59	251.77	113.40	-2.22	-1.15	1.13E-05	6.68E-05
EFAL004_00393	ABC transporter, permease protein	E	Amino acid transport and metabolism	1054354	1055011	420.84	584.05	237.24	-2.27	-1.19	7.79E-08	6.64E-07
EFAL004_00094	ABC transporter, permease protein	E	Amino acid transport and metabolism	1055015	1055674	112.89	158.37	67.21	-2.36	-1.24	0.002107911	0.002512447
EFAL004_00175	Oxalimide carbonoyltransferase	E	Amino acid transport and metabolism	1762907	1752027	9253.82	127769.02	57338.82	-2.21	-1.34	4.34E-11	6.64E-10
EFAL004_00176	arginine deaminase	E	Amino acid transport and metabolism	1764017	1763347	68391.56	92281.51	44901.60	2.26	1.04	5.41E-05	0.002759336
EFAL004_00156	ABC transporter, ATP-binding protein	E	Amino acid transport and metabolism	2288989	2300029	211.26	310.46	111.29	-2.77	-1.47	5.08E-06	1.06E-05
EFAL004_00043	Substrate-binding domain of ABC-type glycine betaine transport system	F	Amino acid transport and metabolism	2448981	2451717	535.00	788.30	361.79	-2.18	-1.33	1.71E-08	1.07E-07
EFAL004_00102	L-lactate oxidase	C	Energy production and conversion; Lipid transport and metabolism; General function prediction only	2153133	2152957	6377.53	11644.73	11103.33	-10.45	-6.39	1.79E-71	3.46E-68
EFAL004_00029	aldehyde alcohol dehydrogenase	CB	Energy production and conversion	237422	240220	28335.15	40326.63	16277.74	-2.48	-1.31	3.12E-13	6.88E-12
EFAL004_00041	malonate decarboxylase, delta subunit	C	Energy production and conversion	347616	347613	28.71	45.26	8.26	5.25	2.57	1.53E-05	8.93E-05
EFAL004_00093	oxidoreductase, FMN-binding protein	C	Energy production and conversion	341473	345765	1237.45	1716.69	734.22	-2.26	-1.38	4.68E-10	6.01E-09
EFAL004_00037	glyoxylase	C	Energy production and conversion	379344	368081	1525.00	2284.08	1651.51	-4.24	-2.64	6.43E-04	2.36E-03
EFAL004_00078	alpha-ketoglutarate oxidase	C	Energy production and conversion	388094	382718	72.75	111.63	23.66	-5.10	-2.35	7.93E-10	9.84E-09
EFAL004_00040	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	C	Energy production and conversion	429910	412278	346.73	474.14	213.43	-2.16	-1.11	3.12E-06	2.04E-05
EFAL004_00064	lumarate reductase flavoprotein subunit	C	Energy production and conversion	694027	693542	830.84	134.16	247.29	-2.20	-1.00	1.03E-05	6.21E-05
EFAL004_00091	Dihydropyridyl dehydrogenase	C	Energy production and conversion	1112899	1115126	6102.49	12595.90	1634.36	-6.16	-2.69	6.75E-23	6.09E-23
EFAL004_00092	dihydropteridine S-methyltransferase	C	Energy production and conversion	1115113	1116757	4095.85	7088.11	1213.59	-6.99	-2.81	7.75E-18	1.90E-16
EFAL004_00095	transferrin-like pyridine-binding domain protein	C	Energy production and conversion	1115781	1117759	4742.12	8610.36	883.89	-8.74	-3.28	8.83E-09	9.47E-08
EFAL004_00094	pyruvate dehydrogenase E2 component, alpha subunit	C	Energy production and conversion	1117761	1118871	15949.03	24421.29	72708.00	-4.32	-2.11	3.54E-31	6.19E-29
EFAL004_00119	formate acyltransferase	C	Energy production and conversion	1189537	1197169	8840.79	12171.70	4569.88	-2.92	-1.65	1.07E-15	8.26E-14
EFAL004_00094	V-type ATP synthase subunit b	C	Energy production and conversion	2118261	2126688	637.56	854.07	431.25	-2.03	-1.02	2.44E-05	0.00112559
EFAL004_00098	V-type ATPase subunit F	C	Energy production and conversion	2118715	2119420	716.08	288.19	143.14	-2.07	-1.01	0.01081835	0.00428985
EFAL004_00136	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	C	Energy production and conversion	2209498	2211112	1770.60	2388.13	1173.07	-2.02	-1.01	8.51E-08	7.18E-07
EFAL004_00101	Acetate kinase	C	Energy production and conversion	2510376	2514802	3482.70	4988.42	1576.38	-2.52	-1.34	8.02E-14	1.01E-12
EFAL004_00007	hypothetical protein	?	Not in GOs	28140	28538	757.22	1055.70	496.73	-2.20	1.34	1.64E-08	1.64E-07
EFAL004_00063	translational elongation factor G	?	Not in GOs	69416	66223	269.21	368.70	149.69	-2.46	-1.30	2.14E-07	1.65E-06
EFAL004_00097	hypothetical protein	?	Not in GOs	764480	765150	72766.67	9363.74	1517.00	-2.03	-1.03	0.00715996	0.002092830
EFAL004_00029	Bacterial mobilization protein C	?	Not in GOs	250235	256666	889.49	1251.05	486.53	-2.55	-1.41	5.66E-07	4.05E-06
EFAL004_00049	phosphoenolpyruvate-dependent Glc transferase	?	Not in GOs	348454	350778	346.57	543.20	143.54	-3.82	-1.53	1.78E-15	8.83E-15
EFAL004_00096	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	?	Not in GOs	397722	398388	61.95	85.95	39.95	-2.10	-1.07	0.00275538	0.021049879
EFAL004_00079	hypothetical protein	?	Not in GOs	494251	494678	822.48	1128.67	476.29	-2.37	-1.24	1.05E-09	1.28E-08
EFAL004_00051	hypothetical protein	?	Not in GOs	517630	517607	750.17	494.01	86.51	-5.77	-2.52	4.38E-14	3.47E-12
EFAL004_00048	hypothetical protein	?	Not in GOs	679326	674814	149.45	199.75	81.24	-2.46	-1.30	4.72E-06	2.91E-05
EFAL004_00075	hypothetical protein	?	Not in GOs	812937	813279	807.22	1222.04	572.40	-2.13	-1.09	2.51E-08	2.44E-07
EFAL004_00092	hypothetical protein	?	Not in GOs	822919	824284	3670.07	5476.76	1971.38	-2.85	-1.51	6.69E-16	1.42E-14
EFAL004_00101	hypothetical protein	?	Not in GOs	1039328	1039547	1703.53	2467.74	835.33	-3.06	-1.61	8.54E-11	1.24E-09
EFAL004_00052	hypothetical protein	?	Not in GOs	1077536	1077652	17517.38	26675.55	9384.22	-2.30	-1.54	2.87E-12	5.29E-11
EFAL004_00053	hypothetical protein	?	Not in GOs	1077774	1077953	7143.53	9581.00	4714.86	-2.03	-1.02	1.52E-08	1.52E-07
EFAL004_00055	hypothetical protein	?	Not in GOs	1078407	1078625	64.00	101.73	26.28	-3.87	-1.55	4.43E-07	3.20E-06
EFAL004_00056	hypothetical protein	?	Not in GOs	1078785	1078927	479.75	791.91	367.57	-4.73	-2.24	7.68E-23	5.94E-21
EFAL004_00057	hypothetical protein	?	Not in GOs	1079667	1079388	262.89	417.74	188.24	-3.87	-1.95	2.48E-15	6.86E-14
EFAL004_00116	hypothetical protein	?	Not in GOs	1174964	1174831	180.16	251.75	108.98	-3.32	-1.71	0.01455988	0.132744998
EFAL004_00113	hypothetical protein	?	Not in GOs	1189607	1189957	1408.47	2102.91	834.13	-2.52	-1.33	2.82E-11	4.44E-10
EFAL004_00120	PRD domain protein	?	Not in GOs	1294683	1295026	169.07	238.34	99.80	2.29	1.26	1.74E-05	6.57E-05
EFAL004_00277	hypothetical protein	?	Not in GOs	1313694	1313955	23.46	86.51	8.40	4.58	2.20	0.000107436	0.002192897
EFAL004_00035	hypothetical protein	?	Not in GOs	1581595	1581730	28.78	42.58	14.88	-2.84	-1.51	0.002294381	0.177210275
EFAL004_00477	hypothetical protein	?	Not in GOs	1592476	1592990	2454.51	3964.40	1993.98	-2.76	-1.04	8.34E-05	0.000469647
EFAL004_00480	hypothetical protein	?	Not in GOs	1592970	1593321	2413.20	2327.44	486.56	-4.56	-2.22	1.58E-15	4.53E-14
EFAL004_00482	hypothetical protein	?	Not in GOs	1512337	1512357	863.82	1217.29	588.77	-2.29	-1.26	4.46E-10	5.83E-09
EFAL004_00569	hypothetical protein	?	Not in GOs	1582969	1583977	71.28	118.02	26.74	-4.11	-2.34	1.17E-08	1.25E-07
EFAL004_00176	hypothetical protein	?	Not in GOs	1803571	1803784	49.41	85.77	15.05	-5.57	-2.48	4.79E-08	4.56E-07
EFAL004_00194	hypothetical protein	?	Not in GOs	2269771	2161157	71293.50	96503.28	47004.71	-2.25	-1.04	5.83E-09	5.79E-08
EFAL004_00234	hypothetical protein	?	Not in GOs	2571774	2371936	112.48	312.22	182.74	-3.14	-1.65	1.93E-10	2.66E-09
EFAL004_00237	hypothetical protein	?	Not in GOs	2611747	2612266	254.90	401.35	196.45	-3.70	-1.89	1.24E-14	3.20E-13
EFAL004_00193	hypothetical protein	?	Not in GOs	2847091	2847424	22.54	33.42	11.67	-2.86	-1.52	0.015361281	0.015169689
EFAL004_00175	hypothetical protein	?	Not in GOs	2848834	2848981	34.82	51.45	17.55	-2.88	-1.53	0.003292614	0.007214459

Table S4A. Selected genes used for RNA-seq validation by qRT-PCR experiments

Gene no.	Gene name	Product name	Gene start	Gene end	RNA-seq fold change	Adjusted <i>P</i> value
EFAU004_00367	<i>dexB</i>	glucan 1,6-alpha-glucosidase	364710	366333	-9,70649	3,20E-27
EFAU004_00377	<i>glpK</i>	glycerol kinase	379384	380881	-6,24214	2,36E-37
EFAU004_00822	-	hypothetical protein	838159	838312	23,27981	2,90E-02
EFAU004_01091	<i>pdhD</i>	Dihydrolipoyl dehydrogenase	1113699	1115106	-6,46491	6,06E-23
EFAU004_01093	<i>pdhB</i>	Transketolase	1116781	1117759	-9,74146	9,47E-08
EFAU004_01205	<i>hupA</i>	DNA-binding protein HU	1233614	1233890	5,04031	9,20E-12
EFAU004_01249	-	universal stress protein	1283807	1284248	-9,04719	2,93E-62
EFAU004_01348	<i>sodA</i>	superoxide dismutase, Mn ²⁺	1395234	1395843	4,01126	2,41E-20
EFAU004_02122	-	L-lactate oxidase	2151833	2152937	-10,48757	3,46E-68
EFAU004_02459	<i>rpmG2</i>	50S ribosomal protein L33	2476344	2476497	8,58134	8,04E-03
EFAU004_02731	-	zeta toxin	2792658	2793333	6,64986	1,17E-07

Table S4B. Primers used for RNA-seq validation by qRT-PCR experiments

Gene ID ^a	Gene name	Encoding protein	Primer ^b	Sequence (5'-3')
Up-regulated genes				
EFAU004_01348	<i>sodA</i>	superoxide dismutase, Mn	sodAqRT-F	GATGGGCTTGGCTTGTAATG
			sodAqRT-R	TGGTGTCTTTCTTCCATCA
EFAU004_01205	<i>hupA</i>	DNA-binding protein HU	hupAqRT-F	GCTTTAGCTAACGGCGAAAA
			hupAqRT-R	CACCAGTTTGTGGGTTACGA
EFAU004_02731	-	zeta toxin	2731qRT-F	GCTGGAAAATCAGAGTTGC
			2731qRT-R	GGAAACTGGGTGCGAAAGTA
EFAU004_02459	<i>rpmG2</i>	50S ribosomal protein L33	rpmqRT-F	AAAGCAGCACTCGCTTGTC
			rpmqRT-R	AAACGTTCCGCCGCTTTTT
EFAU004_00822	-	hypothetical protein	0822qRT-F	GAATTGCTCCAAGCTATTGGT
			0822qRT-R	AAACAATTGCAAAATACCGTCAA
Down-regulated genes				
EFAU004_02122	-	L-lactate oxidase	2122qRT-F	AGTAGGCCAAACGATGGATG
			2122qRT-R	TGGCAAATCAGAATGAGCAG
EFAU004_00367	<i>dexB</i>	glucan 1,6-alpha- glucosidase	dexBqRT-F	AGACGCCTGAGCATGTCTTT
			dexBqRT-R	CGTCTGCTTTTCACTGGACA
EFAU004_01249	-	universal stress protein	1249qRT-F	GCAATTGAAAAAGGCCTGAC
			1249qRT-R	CGATTGGTTCTTTTCGATTCA
EFAU004_01091	<i>pdhD</i>	dihydrolipoyl dehydrogenase	pdhDqRT-F	CTACGCGTCATTCATCCAGA
			pdhDqRT-R	TCCTGGAATCTCGATTGGAC
EFAU004_01093	<i>pdhB</i>	transketolase	pdhBqRT-F	TTCATTAGAAGCCCAATCG
			pdhBqRT-R	ATCTTTTGCATTTGGCAACC
EFAU004_00377	<i>glpK</i>	glycerol kinase	glpKqRT-F	AGCTGAAAAAGGCGAATTGA
			glpKqRT-R	CCGACTGGCATTTCGAGTAAT

3. Rôle de *Enterococcus hirae* dans la réponse antitumorale médiée par le cyclophosphamide

3.1. Publication 4 : Rôle de *E. hirae* dans les effets immunologiques et anticancéreux induits par le cyclophosphamide : vers l'utilisation d' « oncobiotiques » ?

Contexte

L'oncogénèse résulte de liens complexes qui existent entre la cellule et son environnement direct. Les communautés microbiennes présentent au niveau du tractus digestif et des différentes autres niches chez l'homme font partie de ces facteurs environnementaux qui jouent un rôle dans le processus tumoral au niveau intestinal mais aussi extra-intestinal (Zitvogel *et al.* 2015). De nombreuses études ont démontré le rôle capital du microbiote intestinal dans la réponse anticancéreuse grâce à l'utilisation de modèles murins gnotobiotiques ou « germ-free ». Des travaux récents menés par Viaud *et al.* ont démontré que l'utilisation du cyclophosphamide (CTX), agent alkylant anticancéreux de la famille des moutardes azotés, entraîne une altération du microbiote intestinal, endommageait la barrière formée par la muqueuse intestinale et permettait ainsi la translocation de certaines bactéries à Gram positif (dont *E. hirae*) vers les organes lymphoïdes secondaires. Cette translocation, entraîne de façon intéressante le développement de sous-populations lymphocytaires particulièrement efficaces dans le contrôle tumoral. En effet, il a été démontré que chez des souris axéniques ou traitées par antibiotiques à large spectre, l'efficacité anti-tumorale du CTX était compromise. Il est désormais clairement établi que les molécules utilisées lors de chimiothérapies anticancéreuses altèrent sévèrement la barrière intestinale et créent chez la quasi-totalité des patients des phénomènes de mucites. L'administration de certaines bactéries, et en particulier *E. hirae*, qui pourraient ainsi facilement transloquer dans les organes lymphoïdes secondaires et induire une réponse immunitaire anti-tumorale serait donc

une alternative thérapeutique intéressante. L'identification de ces bactéries capables d'influencer l'équilibre hôte-cancer est le fondement de la théorie des oncobiotiques (Viaud *et al.* 2013).

Du fait de notre expertise en tant que Centre National de Référence sur les entérocoques, nous avons été contacté par l'équipe du Pr. Zitvogel (Institut Gustave Roussy, Villejuif) pour entamer une collaboration, afin de caractériser certaines souches de *E. hirae*. Le but de cette collaboration a été de comprendre pourquoi certaines souches de *E. hirae* induisaient une réponse immunitaire particulière chez la souris par une étude phénotypique de sensibilité aux antibiotiques et de formation de biofilm, une étude génomique comparative entre différentes souches de *E. hirae*, d'étudier la colonisation de cette espèce en modèle *Galleria mellonella*, de quantifier les populations de *E. hirae* après gavage oral chez la souris par des méthodes moléculaires sur différentes pièces anatomiques du tube digestif murin et enfin d'étudier l'impact que pouvait avoir le CTX sur la physiologie de cette bactérie par une approche transcriptomique afin d'envisager l'utilisation de cette espèce bactérienne comme oncobiotique dans un futur proche.

Résultats

Nous avons tout d'abord étudié par méthode phénotypique les différents profils de résistance retrouvés chez 26 souches de *E. hirae* de notre collection mais aussi de la souche isolée des organes lymphoïdes secondaires de souris traitées par CTX fournies par l'équipe du Pr. Zitvogel. Ces souches ont été isolées dans divers environnements puisque 12 souches étaient d'origine humaine (dont une responsable d'une bactériémie), 8 souches étaient d'origine environnementale et 5 souches d'origine animale (souches murines). Toutes ces souches n'étaient pas reliées génotypiquement d'après le typage moléculaire effectué par la méthode rep-PCR que nous avons employée. La souche de référence CIP 53.48^T a également

été utilisée comme contrôle. Nous avons également recherché chez ces souches les différents facteurs de virulence décrits chez les deux espèces importantes en clinique que sont *E. faecalis* et *E. faecium* par une approche moléculaire simple. Aucune des souches testées ne présentait de facteur de virulence et les profils de résistance correspondaient bien à la résistance générale retrouvée chez les entérocoques. Ces résultats semblent être rassurants quant à une potentielle utilisation de cette espèce chez l'homme.

Nous avons par la suite étudié la formation de biofilm produite par différentes souches et la colonisation de ces mêmes souches en modèle *Galleria mellonella*, modèle déjà utilisé pour l'étude de la virulence des entérocoques (Lebreton *et al.* 2012; Lebreton *et al.* 2011). Ici encore, les souches testées ne présentaient pas de profils particuliers excepté la souche isolée à partir des hémocultures d'un patient bactériémique, qui présentait une capacité de formation de biofilm plus importante que celle des autres souches ainsi qu'un meilleur pouvoir de colonisation. Afin de valider les résultats de colonisation obtenus chez *G. mellonella* et afin d'étudier de façon plus précise la colonisation de l'appareil digestif par *E. hirae*, nous avons par la suite quantifié les bactéries de cette espèce sur différentes pièces anatomiques du tube digestif murin après gavage oral, par PCR quantitative. Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que *E. hirae* colonisait plus favorablement le jéjunum et le colon de la souris expliquant en partie le phénomène de translocation observé lors du traitement par CTX.

Au cours de ce travail il a été montré que la présence de *E. hirae* au sein d'organes lymphoïdes secondaires augmentait la synthèse de lymphocytes T effecteurs permettant de moduler la réponse immunologique anti-tumorale. Afin de comprendre quel élément bactérien était impliqué dans cette réaction, une étude génomique comparative a été démarrée. Pour ce faire, nous avons extrait l'ADN génomique de 5 souches de *E. hirae* (une souche isolée dans les organes lymphoïdes secondaires murins post-traitement par CTX, une souche humaine isolée à partir d'hémocultures, une souche isolée des fécès de souris, une souche

environnementale et la souche de référence CIP53.48^T) et séquencé ces derniers par la méthode *Pacific Biosciences* (PacBio[®], GATC, Allemagne) nous permettant ainsi d'obtenir 2 à 5 contigs par souche. En parallèle, une étude transcriptomique en présence de mafosfamide, dérivé actif du CTX, a également été menée sur la souche isolée des organes lymphoïdes murins et sur la souche de référence CIP53.48^T. Les résultats actuellement en cours d'analyse nous ont cependant permis de montrer qu'il existait une différence dans l'expression des transcrits entre les différentes conditions testées mais également entre les deux souches de bactéries, en particulier dans le métabolisme des sucres, les systèmes de transports (type PTS) et également dans la synthèse nucléotidique. Cependant le système précis impliqué dans la réponse anti-tumorale n'est pour l'instant pas encore identifié.

Conclusion

Lors de ce travail, l'équipe du Pr. Zitvogel a pu démontrer que l'administration de *E. hirae* avant chimiothérapie permettait d'obtenir un bénéfice important sur la diminution de taille de tumeurs traitées par CTX, laissant présager d'un intérêt certain de cette espèce bactérienne comme probiotique anti-cancéreux (Figure 28).

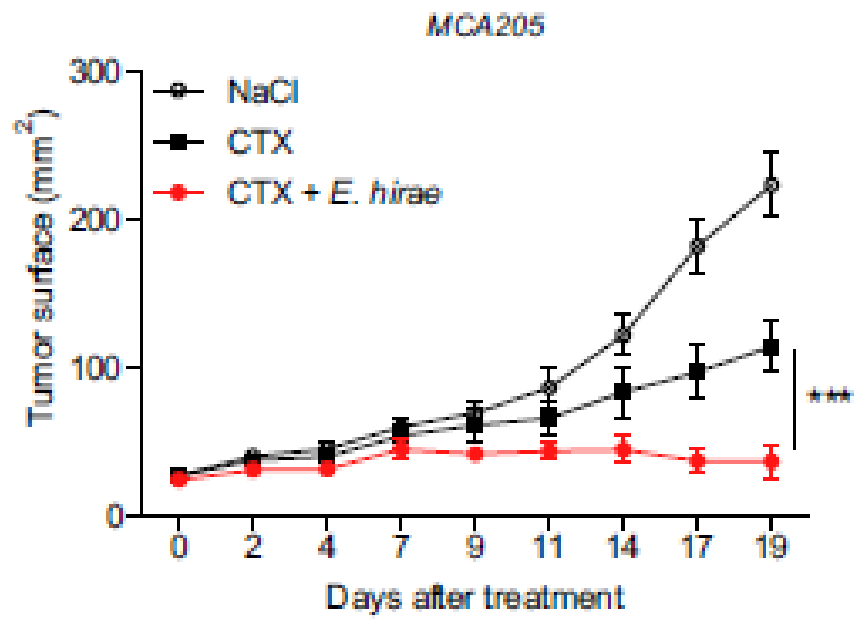


Figure 28. Influence de gavages itératifs d'OMB sur la croissance tumorale après traitement par CTX

(Daillère *et al.* 2016).

Ce travail a fait l'objet d'une publication internationale dans la revue *Immunity* (2016)

Publication 4

***Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* Facilitate**

Cyclophosphamide-induced Therapeutic Immunomodulatory Effects

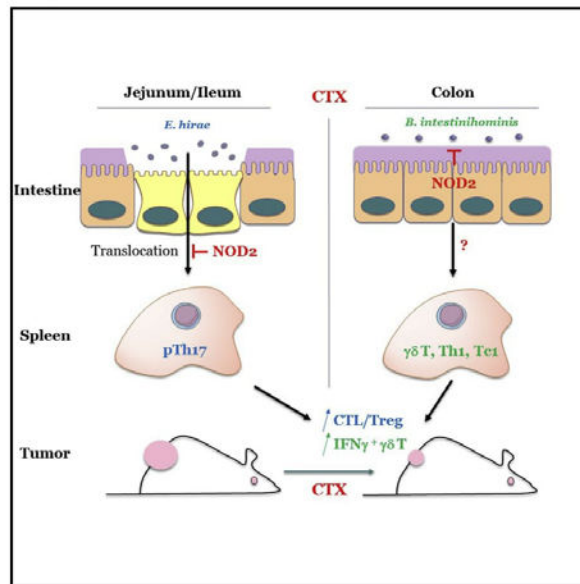
Romain Daillère, Marie Vétizou, Nadine Waldschmitt, Takahiro Yamazaki, Christophe Isnard, Vichnou poirier-Colame, Connie P.M. Duong, Caroline Flament, Patricia Lepage, Maria Paula Roberti, Bertrand Routy, Nicolas Jacquelot, Lionel Apetoh, Sonia Becharef, Sylvie Rusakiewicz, Philippe Langella, Harry Sokol, Guido Kroemer, David Enot, Antoine Roux, Alexander Eggermont, Eric tartour, Ludger Johannes, Paul-Louis Woerther, Elisabeth Chachaty, Jean-Charles Soria, Encouse Golden, Siovia Formenti, Magdalena Plebanski, Mutsa Madondo, Philip Rosenstiel, Didier Raoult, Vincent Cattoir, Ivo Gomperts Boneca, Mathias Chamaillard et Laurence Zitvogel

Immunity. Immuni.2016.09.009

Immunity

Enterococcus hirae and *Barnesiella intestinihominis* Facilitate Cyclophosphamide-Induced Therapeutic Immunomodulatory Effects

Graphical Abstract



Authors

Romain Daillère, Marie Vétizou, Nadine Waldschmitt, ..., Ivo Gomperts Boneca, Mathias Chamaillard, Laurence Zitvogel

Correspondence

laurence.zitvogel@gustaveroussy.fr

In Brief

Cyclophosphamide (CTX) is an immunomodulatory anticancer compound. Daillère et al. show that the antitumoral efficacy of CTX relies on two gut commensal species, *Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* in a NOD2-dependent manner. These two bacteria changed the tumor microenvironment, reducing regulatory T cells and stimulating cognate antitumor CTL responses.

Highlights

- *E. hirae* restored the efficacy of CTX in antibiotics-treated mice
- *E. hirae* and *B. intestinihominis* enhanced cognate anticancer immune responses
- NOD2 receptors limit the bioactivity of *E. hirae* and *B. intestinihominis*
- CD4⁺ T cell responses against *E. hirae* are associated with survival in cancer patients



Daillère et al., 2016, *Immunity* 45, 931–943
 October 18, 2016 © 2016 Elsevier Inc.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.009>

CellPress

***Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* Facilitate Cyclophosphamide-Induced Therapeutic Immunomodulatory Effects**

Romain Daillère,^{1,2,3} Marie Vétizou,^{1,2,3} Nadine Waldschmitt,⁴ Takahiro Yamazaki,^{1,2} Christophe Isnard,^{5,6} Vichnou Poirier-Colame,^{1,2,3} Connie P.M. Duong,^{1,2,7} Caroline Flament,^{1,2,7} Patricia Lepage,⁸ Maria Paula Roberti,^{1,2,7} Bertrand Routy,^{1,2,3} Nicolas Jacquilot,^{1,2,3} Lionel Apetoh,^{9,10,11} Sonia Becharaf,^{1,2,7} Sylvie Rusakiewicz,^{1,2,7} Philippe Langella,⁸ Harry Sokol,^{8,12,13} Guido Kroemer,^{14,15,16,17,18,19} David Enot,^{1,15}

(Author list continued on next page)

¹Institut de Cancérologie Gustave Roussy Cancer Campus (GRCC), 114 rue Edouard Vaillant, Villejuif, 94805, France

²Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), U1015, GRCC, Villejuif, 94805, France

³University of Paris-Saclay, Kremlin Bicêtre, 94270, France

⁴University Lille, CNRS, Inserm, CHRU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019-UMR 8204-CIIL, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, 59000 Lille, France

⁵Université de Caen Basse-Normandie, EA4655 U2RM (Équipe Antibio-Résistance), Caen, 14033, France

⁶CHU de Caen, Service de Microbiologie, Caen, 14033, France

⁷Center of Clinical Investigations in Biotherapies of Cancer (CICBT) 1428, Villejuif, 94805, France

⁸Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

⁹Lipids, Nutrition, Cancer, INSERM, U866, Dijon, 21078, France

¹⁰Department of Medicine, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, 21078, France

¹¹Department of Oncology, Centre Georges François Leclerc, Dijon, 21000, France

¹²AVENIR Team Gut Microbiota and Immunity, ERL, INSERM U 1157/UMR 7203, Faculté de Médecine, Saint-Antoine, Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Paris, 75012, France

¹³Service de Gastroentérologie, Hôpital Saint-Antoine, Assistance Publique—Hôpitaux de Paris (APHP), Paris, 75012, France

¹⁴INSERM U848, 94805 Villejuif, France

¹⁵Metabolomics Platform, Institut Gustave Roussy, Villejuif, 94805, France

¹⁶Equipe 11 labellisée Ligue contre le Cancer, Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM U 1138, Paris, 75006, France

¹⁷Pôle de Biologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, 75015, France

¹⁸Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, 75006, France

¹⁹Karolinska Institute, Department of Women's and Children's Health, Karolinska University Hospital, Stockholm, 17176, Sweden

²⁰INSERM U970, Paris Cardiovascular Research Center, Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, 75015, France

²¹Service d'immunologie biologique, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, 75015 France

²²INSERM U1143, 75005 Paris, France

²³Institut Curie, PSL Research University, Endocytic Trafficking and Therapeutic Delivery group, Paris, 75248, France

²⁴CNRS UMR 3666, Paris, 75005, France

(Affiliations continued on next page)

SUMMARY

The efficacy of the anti-cancer immunomodulatory agent cyclophosphamide (CTX) relies on intestinal bacteria. How and which relevant bacterial species are involved in tumor immunosurveillance, and their mechanism of action are unclear. Here, we identified two bacterial species, *Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* that are involved during CTX therapy. Whereas *E. hirae* translocated from the small intestine to secondary lymphoid organs and increased the intratumoral CD8/Treg ratio, *B. intestinihominis* accumulated in the colon and promoted the infiltration of IFN- γ -producing $\gamma\delta$ T cells in cancer lesions. The immune sensor, NOD2, limited CTX-induced cancer immunosurveillance and the

bioactivity of these microbes. Finally, *E. hirae* and *B. intestinihominis* specific-memory Th1 cell immune responses selectively predicted longer progression-free survival in advanced lung and ovarian cancer patients treated with chemo-immunotherapy. Altogether, *E. hirae* and *B. intestinihominis* represent valuable “oncomicrobiotics” ameliorating the efficacy of the most common alkylating immunomodulatory compound.

INTRODUCTION

Cancer results from a complex interplay between gene regulation and its environment. Microbial communities inhabiting our intestine and other portals of entry represent unappreciated



Antoine Roux,^{1,2,3,18} Alexander Eggermont,^{1,3} Eric Tartour,^{20,21} Ludger Johannes,^{22,23,24} Paul-Louis Woerther,²⁵ Elisabeth Chachaty,²⁵ Jean-Charles Soria,^{1,3} Encouse Golden,²⁶ Silvia Formenti,²⁶ Magdalena Plebanski,²⁷ Mutsa Madondo,²⁷ Philip Rosenstiel,²⁸ Didier Raoult,²⁹ Vincent Cattoir,^{5,6,30} Ivo Gomperts Boneca,³¹ Mathias Chamailard,⁴ and Laurence Zitvogel^{1,2,3,7,32,*}

²⁵Service de microbiologie, GRCC, Villejuif, 94805, France

²⁶Department of Radiation Oncology, Weill Cornell Medicine, New York, NY, USA

²⁷Department of Immunology and Pathology, Monash University, Alfred Hospital Precinct, Melbourne, Prahran, Victoria 3181, Australia

²⁸Institute of Clinical Molecular Biology, Christian-Albrechts-University and University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, 24105 Kiel, Germany

²⁹AIX MARSEILLE UNIVERSITE, URMITE (Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes), UMR 7278, INSERM 1095, IRD 198, Faculté de Médecine, Marseille 13005, France

³⁰CNR de la Résistance aux Antibiotiques, Laboratoire Associé Entérocoques, Caen, 14033, France

³¹Institut Pasteur, Unit Biology and Genetics of the bacterial Cell Wall, Paris, 75015, France

³²Lead author

*Correspondence: laurence.zitvogel@gustaveroussy.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.009>

environmental factors that appear to play a role in intestinal and extraintestinal carcinogenesis (Zitvogel et al., 2015). Pioneering studies performed in germ-free and gnotobiotic animals or in antibiotic-treated rodents revealed an unsuspected role of commensals in tumorigenesis. In the colon cancer or hepatocarcinoma, microbes can directly be transforming agents (Sears and Garrett, 2014) by providing a toxic metabolite, an oncogenic product or inducing an inflammatory milieu which will culminate in genomic instability and/or DNA damage responses and/or immune escape (Gur et al., 2015; Louis et al., 2014). A role for Toll-like receptor 5-dependent commensal microbes in interleukin-6 (IL-6) or IL-17-driven systemic inflammation was demonstrated in extraintestinal neoplasia (Rutkowski et al., 2015). In contrast, other observations support a beneficial role of distinct bacteria against cancer. Prolonged exposure to a combination of metronidazole and ciprofloxacin tripled breast cancer (BC) occurrence in protooncogene HER2/neu driven-transgenic mice (Rossini et al., 2006). In humans, epidemiological studies suggested a dose-dependent association between antibiotic use and risk of BC (Blaser, 2011; Velicer et al., 2004). The beneficial role of the intestinal microbiota was first reported by Paulos et al. showing that total body irradiation promoted a LPS-TLR4-dependent activation of antigen-presenting cells facilitating the efficacy of adoptive T cell transfer (Paulos et al., 2007). Next, Iida et al. reported that bacteria-associated TLR4 agonists accounted for the ROS and TNF- α -mediated antitumor effects of tumor-infiltrating myeloid cells (MDSC) during platinum-based anticancer therapies and immunomodulatory regimen (Iida et al., 2013). We also showed that cyclophosphamide (CTX) promoted the translocation of distinct Gram⁺ bacteria (mainly *Lactobacillus johnsonii* and *Enterococcus hirae*) that mounted effector pathogenic Th17 (pTh17) cell responses associated with tumor control (Viaud et al., 2013). We and others showed that distinct intestinal bacterial species belonging to *Bacteroidales* and *Burkholderiales* or *Bifidobacteriales* orders influenced the tumor microenvironment, contributing to the efficacy of anti-CTLA4 or anti-PDL-1 Ab, respectively (Vétizou et al., 2015; Sivan et al., 2015).

Hence, the intestinal microbiota ecosystem might control not only the gut immune homeostasis but also the inflammatory and/or immune tone of secondary lymphoid organs, culminating in shaping the tumor microenvironment. This hypothesis implies that anticancer therapeutics alter the delicate mutualistic symbi-

osis between intestinal epithelial cells, the local microbiome, and the lamina propria resident-immune system, contributing to reprogram anticancer immune responses. The precise identification of bacterial genera capable of linking intestinal and anti-cancer immune responses is key to the emerging field of "oncomicrobiotics" (OMBs), i.e., immunogenic commensals influencing the host-cancer equilibrium.

Here, we identified two intestinal OMBs, namely *E. hirae* and *Barnesiella intestinihominis*, that both act to orchestrate the anticancer therapeutic effects of CTX. The small intestine-resident Gram⁺ bacteria *E. hirae* induces systemic pTh17 cell responses associated with tumor antigen-specific, MHC class I-restricted cytotoxic T cells (CTL) and increased intratumoral CTL/T regulatory (Treg) cell ratio. The colon resident Gram⁻ *B. intestinihominis* boosts systemic polyfunctional Tc1 and Th1 cell responses and reinstates intratumoral IFN- γ producing $\gamma\delta$ T cells. Both commensals reduced Treg cells in the tumor microenvironment (Foxp3 and/or $\gamma\delta$ T17 cells). These two immunogenic commensals are kept in check by intestinal NOD2 receptors, limiting their direct proapoptotic effects on epithelial cells and their accumulation in vivo. Memory Th1 immune responses toward *E. hirae* or *B. intestinihominis* are clinically relevant, dictating progression-free survival (PFS) in end-stage cancer patients.

RESULTS

E. hirae Restored the Efficacy of CTX in Antibiotics-Treated Mice

We previously reported that broad spectrum antibiotics (ATBs) and vancomycin decreased the anticancer activity of CTX in vivo. We then showed that CTX compromised the integrity of the intestinal epithelium, promoting the translocation of distinct Gram⁺ bacteria in secondary lymphoid organs that could elicit *L. johnsonii* or *E. hirae* specific Th1 cell responses (Viaud et al., 2013). However, we did not demonstrate the causal relationship between the translocating Gram⁺ bacteria and the CTX-induced tumoricidal activity.

To analyze the antitumor effects of those Gram⁺ bacterial species capable of translocating to secondary lymphoid organs post-CTX, we performed a gut colonization of mouse intestines with 10⁹ *E. hirae* (clone 13144), *L. johnsonii* or control bacteria

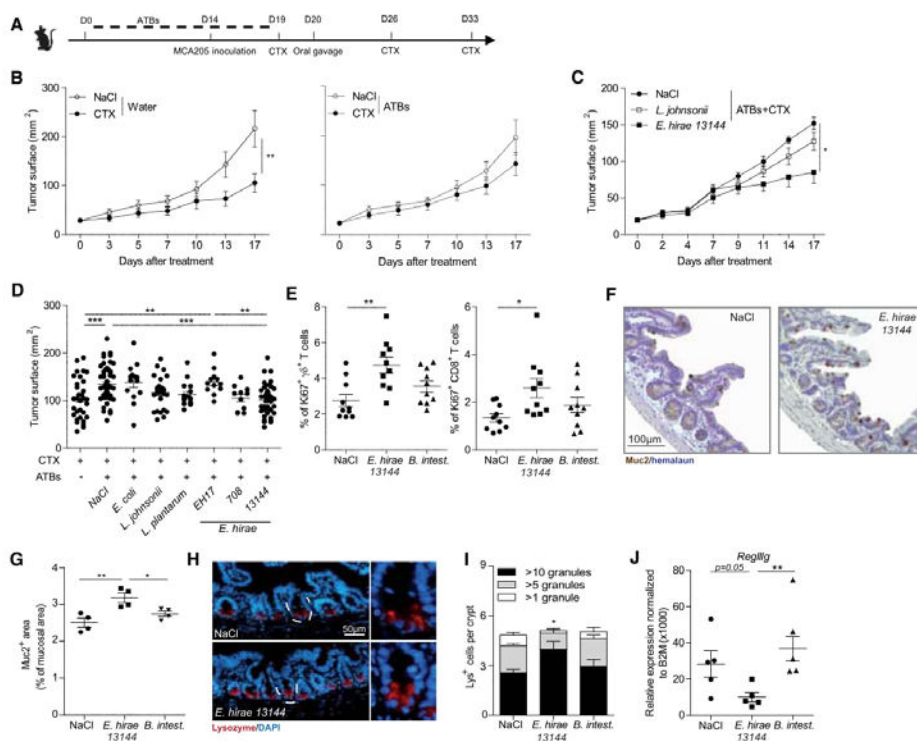


Figure 1. The Oncobiotic *E. hirae* Boosts CTX Efficacy in ATBs-Induced Dysbiosis

(A) Experimental setting. (B–D) OMB effects of *E. hirae*. Tumor growth kinetics with or without ATBs (B) and after oral gavage *E. hirae*, *L. johnsonii* (C), or other bacterial species (D). Day 0 in B represents day 19 in (A). A typical growth curve is depicted for five mice per group (B and C) and tumor sizes at day 19 post-CTX are pooled for 2–4 experiments containing at least five mice per group (D). (E) Proliferation of intraepithelial lymphocytes of the small intestine 2 days after oral gavage assessed by flow cytometry. Each dot represents one mouse intestine (F and G). Hyperplasia of goblet cells 4 days after oral gavage with *E. hirae* assessed by immunohistochemistry staining. One micrograph picture is representative of a control and *E. hirae*-treated mice. The graph depicts the area of positive cells/mucosal area (one dot per mouse) (H–I). Lysozyme containing Paneth cells at the bottom of the crypts in the jejunum. One micrograph picture is representative of a control and *E. hirae*-treated mice at two different magnifications. Enumeration of positive cells/crypt with different amounts of granules in three categories in four mice per group (means \pm SEM for a minimum of 10 crypts). (J) Transcription levels of the antimicrobial peptide RegIII γ assessed by qPCR of the intestinal mucosa 2 days after oral gavage. Statistical analyses were performed by a linear mixed-effects modeling (B and C), Dunnett (D, E, and G) and Mann-Whitney (I and J) tests. All data are expressed as mean \pm SEM: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. B. intest., *Barnesiella intestinihominis*. Related to Figure S1.

in MCA205 sarcoma-bearing mice rendered dysbiotic by a 14 day-broad spectrum ATBs regimen (Figure 1A). Broad spectrum ATBs prevented the metronomic CTX-mediated control of tumor growth (Figure 1B). However, oral gavage with *E. hirae* clone 13144 selectively restored the CTX-mediated antitumor effects whereas our *L. johnsonii*, *E. coli*, or *Lactobacilli* isolates failed to do so (Figures 1C and 1D).

To assess the effective colonization by *E. hirae*, we performed ex vivo cultivation of feces on agar plates (followed by mass spectrometry identification of bacteria), qPCR with enterococci-specific probes, and FISH analyses of mucosal and

luminal compartments at various locations of the small and large intestine. These assays concluded that by 24 hr post-gavage, all detectable bacteria were *E. hirae*, which were very abundant in the jejunum and ileum and were not only present in the lumen but also in the mucosa for at least 4 days (Figures S1A–S1D). Additionally, supplementation with *E. hirae* (and not colonization with a Gram- bacteria residing in the colon such as *B. intestinihominis*) induced the proliferation of $\gamma\delta$ T cells and CD8⁺ T cells residing in the epithelial layer (Figure 1E), as well as an hyperplasia of mucin-producing goblet cells (Figures 1F and 1G) and lysozyme-containing Paneth cells

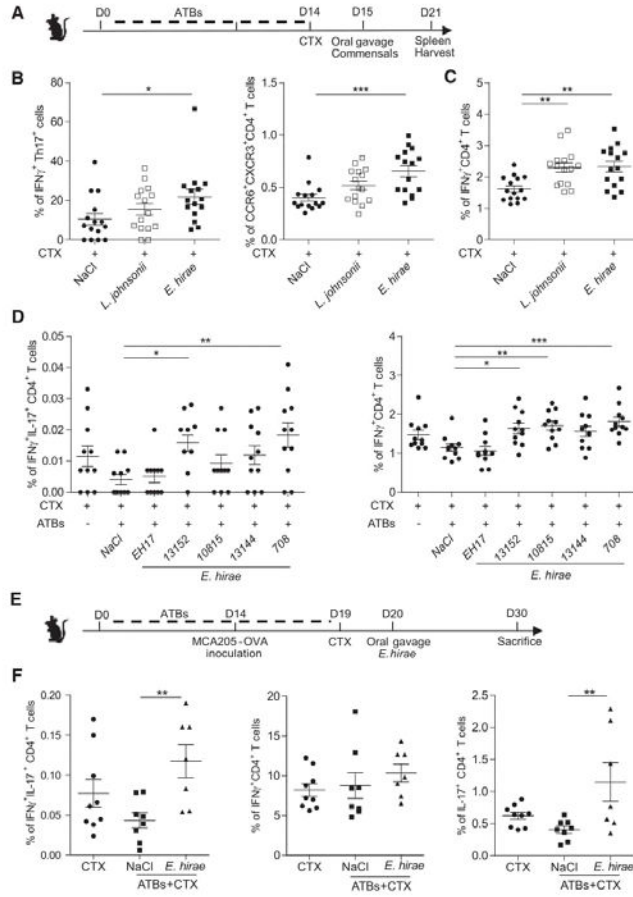


Figure 2. Immunomodulatory Effects of *E. hirae* in Naive and Tumor Bearers
(A) Experimental setting.
(B and C) Flow cytometric analyses of Th1 and pTh17 cells after oral gavage with various commensals (including *E. hirae* 13144). CD4⁺ T cells expressing or co-expressing IFN- γ and/or IL-17 (**B and C**) or CXCR3 and CCR6 (**B**, right panel) in the gate of live CD3⁺ splenocytes.
(D) Effects of five different isolates of *E. hirae* shown for two independent experiments in naive mice.
(E and F) Experimental setting in tumor bearers (**E**). Flow cytometric immunomonitoring of pTh17 (**left panel**), Th1 (**middle panel**), and Th17 (**right panel**) (**F**). Two experiments are depicted with data expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed by a Dunnett test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Related to [Figures S2](#) and [S3](#) and [Table S1](#).

We tested various *E. hirae* isolates derived from human, mouse, or environmental ecosystems to analyze their differential immunogenicity in vivo and their capacity to mediate “oncomicrobiotic” property. These strains, which were equally susceptible to antimicrobial agents ([Table S1](#)), failed to produce virulence gene products (such as *cob*, *cylA*, *efaA_{efm}*, *efaA_{efs}*, *cpd*, *cylB*, *ccf*, *esp*, *agg*, *cylM*, *copZ*) as opposed to pathogenic *Enterococcus faecalis*. Of note, *E. hirae* 13144 (the isolate we cultivated from mouse spleens post-CTX) failed to exhibit virulence in the in vivo infection model *Galleria mellonella* ([Figure S2D](#)). The investigation of clonal relationship between these *E. hirae* isolates by rep-PCR revealed an important genomic diversity within these strains ([Figure S2C](#)). Half of the isolates induced pTh17 and Th1 immune responses ([Figure 2D](#)) with only one human isolate (clone 708) exhibiting Tc1 potential in naive mice associated with OMB properties ([Figure 1D](#), data not shown). The only human isolate of *E. hirae* (clone EH17) capable of forming ex vivo biofilms on adherence assays harbored no immunogenic nor OMB properties ([Figures 1D](#) and [2D](#) and [S2E](#)). We next re-examined these immunogenic properties in the setting of a growing sarcoma MCA205 known to influence the gut microbiome ([Viaud et al., 2013](#)) ([Figure 2E](#)). In tumor bearers, *E. hirae* 13144 induced Th17 and pTh17 but not Th1 immune responses ([Figure 2F](#)), suggesting that inflammatory cytokines (such as TGF- β , IL-6, IL-1 β , IL-23) involved in pTh17 cell differentiation may fluctuate with the tumor bulk. Of note, the poorly immunogenic *E. hirae* clone EH17 did not induce high IL-1 β secretion levels from dendritic cells ex vivo (as opposed to clone 13144 or clone 708) ([Figure S3](#)).

Thus, *E. hirae* exerts a capacity to induce pTh17 cells in secondary lymphoid organs of CTX-treated and dysbiotic animals, associated with its OMBs properties.

([Figures 1H](#) and [1I](#)) associated with a slight reduction of the antimicrobial peptide RegIII γ ([Figure 1J](#)).

We next analyzed the immunological effects of *E. hirae* in the secondary lymphoid organs of naive animals. Six days after bacterial colonization, we harvested splenocytes to perform a flow cytometric analyses focusing on IFN- γ ⁺ and/or IL-17⁺, as well as CXCR3⁺ and/or CCR6⁺ T cells ([Figure 2A](#)). In naive mice, *E. hirae* failed to give rise to CD3⁺CD4⁺IL-17⁺ or CCR6⁺ T cells (called Th17 cells, data not shown) but selectively mounted pTh17 immune responses characterized by the splenic accumulation of rare double positive IFN- γ ⁺IL-17⁺ cells or CCR6⁺ CXCR3⁺CD4⁺ T cells ([Figure 2B](#)) eventually leading to the differentiation of bona fide CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ or CXCR3⁺ T cells (called Th1 cells, [Figures 2C](#) and [S2A](#)), polarization corroborated by cell sorting and qPCR detecting *Tbx21* and *Il21* gene expression ([Figure S2B](#)).

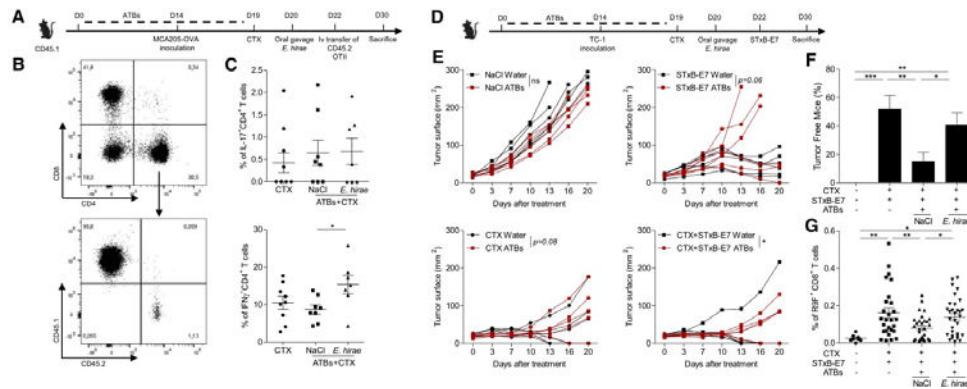


Figure 3. *E. hirae* Induces Tumor Antigen-Specific Cognate T Cell Responses

(A) Experimental setting. Adoptive transfer of CD45.2⁺ OTII transgenic CD4⁺ T cells into CD45.1⁺ hosts bearing OVA-expressing sarcomas and subjected to oral gavage with NaCl or *E. hirae*. (B and C) Percentages of Th1 and Th17 cells in tumor bearers post-CTX with or without ATBs by flow cytometry. A representative dot plot gating on CD45.2⁺CD4⁺ T cells for the intracellular staining is shown. Pooled data from two independent experiments are shown, each dot representing one mouse. (D–F) Experimental setting with HPV16-E7 expressing TC1 tumors. Tumor growth curves with or without ATBs (E) in a representative experiment out of two. Percentages of complete tumor eradication (F) and monitoring of the proportions of D^β-E7_{39–47} tetramer binding CD8⁺ T cells in the spleens at sacrifice (five concatenated experiments, each dot representing one mouse). (G). Statistical analyses were performed by Dunnett test (C and G), linear mixed-effects modeling (E), and Firth's penalized-likelihood logistic regression modeling (F). All data are expressed as mean ± SEM: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

E. hirae Enhanced Cognate Anticancer Immune Responses

To investigate whether *E. hirae*-associated systemic immune responses could promote anti-tumor cognate T cell responses, we set up two distinct preclinical models. First, tumor cell lines genetically modified to express the ovalbumine antigen (OVA) were implanted subcutaneously (s.c.) following a 14-day-broad spectrum ATBs therapy. Then, animals were adoptively transferred with OVA_{323–339} specific MHC class II-restricted OTII TCR transgenic T cells and treated with CTX (Figure 3A). We monitored the immunological impact of an oral gavage with *E. hirae* on the activation of congenic CD45.2⁺ OTII cells in the spleen. In contrast to syngenic CD45.1⁺ T cells, which differentiated into Th17 cells (Figure 2E), OTII transgenic T were geared toward Th1 cells following colonization with *E. hirae* 13144 (Figures 3B and 3C). Next, we used a s.c. TC1 model expressing the human papillomavirus 16 (HPV16) E7 (Vingert et al., 2006) in which tumor regression could be obtained by vaccinating mice using a non-replicative delivery system composed of the B subunit of Shiga toxin coupled to E7 antigen (STxB-E7) (Figure 3D). This immunization protocol elicited polyfunctional D^β-E7_{39–47} tetramer binding CD8⁺ T cells (Sandoval et al., 2013). Interestingly, the combination of STxB-E7 and CTX ("vaccine") was synergistic, eventually leading to complete tumor eradication (Figure 3E). Here again, a negative impact of broad spectrum ATBs on the efficacy of the "vaccine" was observed with a marked reduction of complete tumor rejection rates in ATBs-compared with water-treated groups (Figures 3E and 3F). Next, we monitored the impact of an oral gavage with *E. hirae* on the probability of complete cure and on the expansion of

polyfunctional D^β-E7_{39–47} tetramer binding CD8⁺ T cells in the spleens post-ATBs. Indeed, *E. hirae* compensated the lack of efficacy of the cancer "vaccine" in ATBs-treated mice (Figure 3F) with or without the use of STxB-E7 (data not shown) and restored, in ATBs-treated mice, the expansion of D^β-E7_{39–47} tetramer binding CD8⁺ T cells observed in naive mice CTX-treated positive controls (Figure 3G). Thus, mono-association of "gut sterilized" mice with *E. hirae* could partially restore CTX-induced anticancer Th1 cell or CTL responses, keeping in check tumor progression.

Porphyromonadaceae Family Members (genus *Barnesiella*) Are Involved in the Long-Term Immunogenicity of CTX

We previously showed that CTX could induce Gram⁺ bacteria translocation (Viaud et al., 2013). To analyze the potential impact of the major pattern-recognition receptors in Gram⁺ bacterial translocation to the mesenteric LN or spleen, we screened Myd88-, TLR2-, TLR4-, TLR2xTLR4-, and NOD1xNOD2-deficient mice for the presence of cultivatable commensals in secondary lymphoid organs at 48 hr post-CTX. We found a significant increase of bacterial translocation in these *Nod1*^{-/-}*Nod2*^{-/-} mice (Figure 4A and data not shown). We next monitored tumor growth kinetics in MCA205-bearing WT versus *Nod1*^{-/-}*Nod2*^{-/-} C57BL/6 mice. The CTX antitumor efficacy was markedly enhanced in *Nod1*^{-/-}*Nod2*^{-/-} hosts compared with age matched controls bred in the same animal facility (Figure 4B). We phenocopied these effects using pharmacomimetics, i.e., agonists for NOD1 and NOD2 receptors, namely the peptidoglycans MurNAc-L-Ala-γ-D-Glu-mDAP

Immunity 45, 931–943, October 18, 2016 935

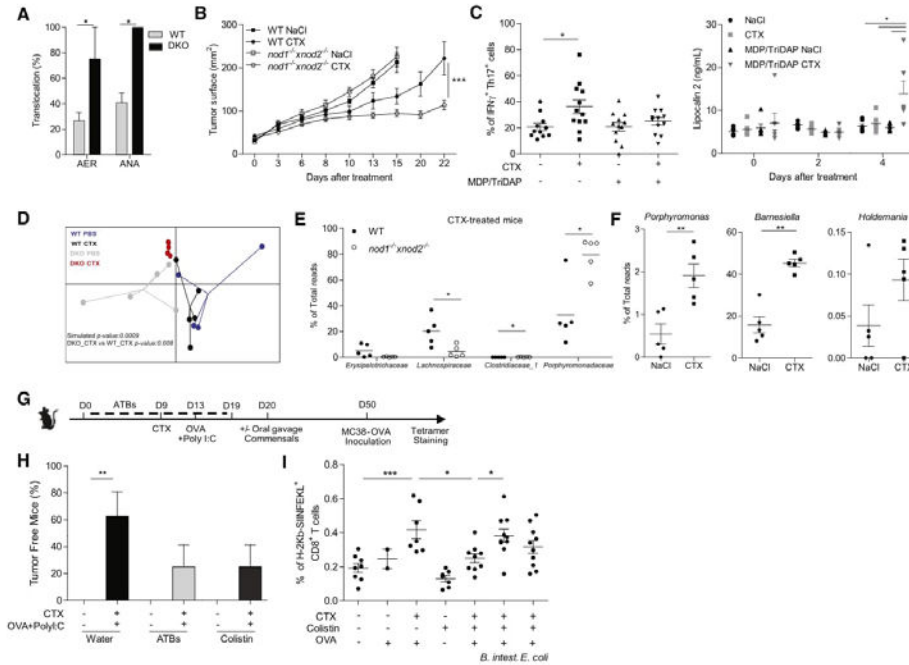


Figure 4. NOD-Dependent *Bacteriella* Accumulation and CTX-Induced Long Term Memory Tc1 Responses

(A) CTX-induced translocation of bacteria in WT versus *Nod1*^{-/-}*Nod2*^{-/-} (DKO) mice. Naive mice were treated with one i.p. injection of CTX 100 mg/kg and mLN were cultivated on agar plates in aerobic (AER) or anaerobic (ANA) conditions 48 hr later followed by mass spectrometry identifying *E. hirae*, *L. johnsonii*, or *L. reuteri*. The percentages of positive plates are depicted for two independent experiments. (B) Tumor growth curves after administration of CTX in WT versus DKO mice. One representative experiment out of two is depicted. (C) Flow cytometric analyses of splenic CD4⁺ T cells co-expressing IFN- γ in the gate of live IL-17⁺ T splenocytes in WT mice treated with systemic daily administration of NOD agonists. Concatenated data of two experiments are shown, one dot representing one mouse (C, left panel). ELISA monitoring of lipocalin-2 in the feces of mice treated with CTX \pm NOD agonists (C, right panel). (D) Principle component analyses of the fecal microbiota of CTX-treated WT mice versus their DKO littermates. Feces have been harvested at day 7 post-CTX in 5 naive C57BL/6 mice. (E) Details of the bacterial families residing in feces significantly under- or overrepresented in CTX treated groups comparing WT versus DKO mice. (F) Analyses of most significant variations of the family members induced by CTX in DKO animals. (G) Experimental setting. The percentages of tumor-free mice were scored for two experiments (H). The percentages of H-2^b-SIINFELK tetramer-binding CD8⁺ T cells are indicated for each mouse in three individual experiments (I). Statistical analyses were performed by a linear mixed-effects modeling (B), Firth's penalized-likelihood logistic regression modeling (A and H), Dunnett (C and I), and Mann-Whitney (D–F) tests. All data are expressed as mean \pm SEM: **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001. B. intest., *Bacteriella intestinalis*. Related to Figure S4 and Table S2.

(TriDAP) and muramyl dipeptide in WT mice, respectively. These compounds reduced CTX-mediated pTh17 cells in the spleen (Figure 4C, left panel). This was found to be associated with increased intestinal release of the antimicrobial peptide lipocalin-2 in stools that might in turn facilitate epithelial repair and reduction of intestinal permeability (Figure 4C, right panel).

Consequently, we performed pyrosequencing analyses of 16S rRNA gene amplicons from both the mucosa of the small intestine and stools harvested from naive WT mice versus their *Nod1*^{-/-}*Nod2*^{-/-} littermates 7 days post-CTX. Principle component analyses revealed that bacterial community structures were significantly different between CTX groups from WT versus gene

deficient mice for the families and genera at both locations (Figures 4D, S4, and Table S2 for the OTU). There was an overrepresentation of *Clostridiaceae* in the small intestines (Figure S4C), mainly attributable to segmented filamentous bacteria (Table S2) and of the *Porphyromonadaceae* family (mainly genus *Bacteriella*) and genus *Holdemania* in the stools. Moreover, there was a relative loss of *Erysipelotrichaceae* in the small intestine as well as *Lachnospiraceae* in feces of *Nod1*^{-/-}*Nod2*^{-/-} naive mice receiving CTX compared with PBS (Figures 4E and 4F and S4).

The antitumor effects mediated by CTX were compromised in the presence of colistin, an antibiotic regimen killing mainly Gram⁻ bacteria (Viaud et al., 2013). Taking into account the

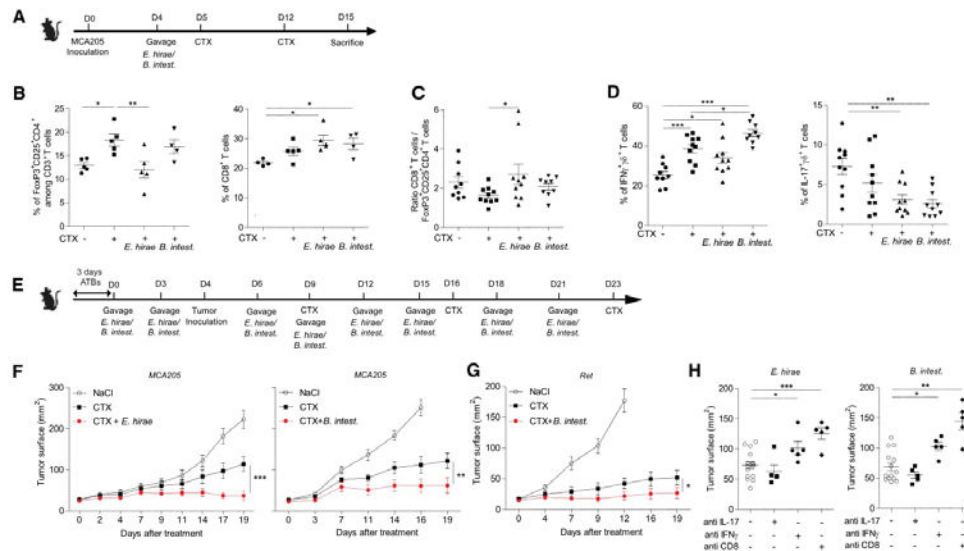


Figure 5. OMBs modulate the tumor microenvironment in the context of CTX in the absence of ATBs

(A–E) Experimental settings. Administration of OMBs in tumor bearers in once in the absence of ATBs (A) and in a repetitive manner after three days of ATBs (E). (B–D) Flow cytometry analyses of TIL infiltrates, gating on Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ T cells (Treg) and CD8⁺ T cells (B), allowing to calculate the ratio between CD8⁺ T/Treg (C), as well as of IFN- γ or IL-17 producing $\gamma\delta$ T cells (D).

(F and G) Influence of iterative gavages of OMBs on the CTX-mediated tumor growth curves against MCA205 (F) and Ret melanoma (G) in a representative experiment out of two yielding similar results.

(H) Effects of neutralizing anti-IFN- γ , IL-17, or depleting anti-CD8 antibodies on the antitumor effects of OMBs. Statistical analyses were performed by Dunnett (B and D) and Mann-Whitney (C and H) tests, as well as a linear mixed-effects modeling (F and G). All data are expressed as mean \pm SEM: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001. B. intest, *Barnesiella intestinihominis*. Related to Figure S5.

overrepresentation of Gram⁻ genera isolated in *Nod1*^{-/-}*Nod2*^{-/-} mice exhibiting a superior anticancer response to CTX than WT mice, we addressed the role of Gram⁻ bacteria in the adjuvant effect of CTX in the context of a vaccine comprising a cognate cancer antigen, such as the OVA+polyI:C-based cancer immunization procedure (Figure 4G). Indeed, broad spectrum ATBs, as well as colistin, prevented the long-term protection of this cancer vaccine against the lethal challenge with OVA-engineered MC38 tumor cells (Figure 4H). Moreover, colistin prevented the elicitation of H-2K^b/SIINFEKL-restricted CD8⁺ CTL responses (Figure 4I). To scrutinize which Gram⁻ gut adjuvants could possibly be involved in CTX-induced long term cognate immune responses, we performed an oral gavage with two Gram⁻ species (either *B. intestinihominis* or *E. coli*) after conditioning with colistin during the immunization schedule (Figure 4G). *B. intestinihominis* was selectively capable of restoring H-2K^b/SIINFEKL-restricted CD8⁺ CTL responses in colistin-treated mice that received the CTX-based vaccine (Figure 4I).

Altogether, distinct *Porphyromonadaceae* family members (genus *Barnesiella*) were overrepresented in the large intestine of CTX-treated mice in conditions of NOD1 and NOD2 functional deficiencies, which might be relevant to account for long-term memory Tc1 cell immune responses protective against tumor establishment.

Considering that two commensals, *E. hirae* or *B. intestinihominis*, appeared regulated either by translocation or accumulation in feces immediately after CTX administration, we next addressed whether they could modulate systemic and local tumor immunity in the absence of ATBs-induced dysbiosis (Figure 5A). Both OMBs induced an inversion of the CD4/CD8 T cell ratio in the spleen, facilitating the accumulation of effector CD8⁺ T cells (Figures S5A and 5B). Whereas *E. hirae* maintained its capacity to induce pTh17 in the spleen in the absence of ATBs (Figure S5C), *B. intestinihominis* induced polyfunctional CD4⁺ Th1 and CD8⁺ Tc1 cells (Figure S5D). Importantly, *E. hirae* markedly reduced the numbers of regulatory Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ tumor infiltrating lymphocytes (TILs), increasing the CTL/Treg cell ratio (Figures 5B and 5C), whereas *B. intestinihominis* augmented the proportions of IFN- γ -producing $\gamma\delta$ TILs while decreasing IL-17-producing $\gamma\delta$ TILs, the latter phenomenon being also observed with the other OMBs (Figure 5D).

Repetitive gavages of either OMBs (Figure 5E) were markedly effective in ameliorating the CTX activity against MCA205 fibrosarcoma (Figure 5F). Interestingly, gavages with *B. intestinihominis* was also effective against Ret melanoma (Figure 5G). Of note, in the absence of CTX, *E. hirae* was not able to impact the natural tumor growth of MCA205 sarcoma (Figures S5E and S5F). The neutralization of IFN- γ (but not that of IL-17) or the depletion of

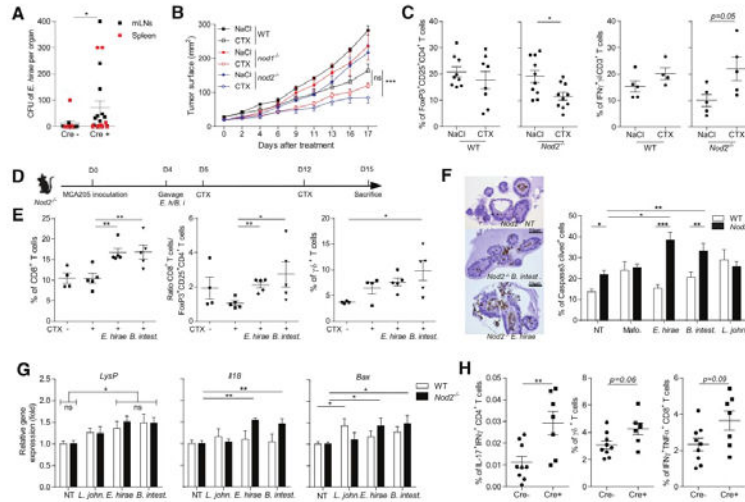


Figure 6. NOD2 Is a Gut Immune Checkpoint Limiting the Biological Effects of OMBs

(A) Villin-driven NOD2 deficiency induced increased translocation of *E. hirae*. *Nod2*^{fl/fl}; villin-Cre⁺ and Cre⁻ conditional mice were treated with tamoxifen and were orally gavaged with *E. hirae* prior to and right after 100 mg/kg of CTX ip. Mesenteric LN or spleen were cultivated 48 hr later as in Figure 4A. The number of colonies identified by mass spectrometry as being *E. hirae* per plate are depicted (Cre⁺ versus Cre⁻). Of note, there was also an increase of the percentages of positive plates (data not shown).

(B) Tumor growth curves after administration of CTX (as in Figure 4B) in WT versus *Nod1*^{-/-} or *Nod2*^{-/-} single KO mice. One representative experiment out of two is depicted (B).

(C) Flow cytometric determination of TIL infiltrates in WT versus *Nod2*^{-/-} genetic strains at day 10 post-CTX.

(D and E) Administration of OMBs by gavage before metronomic CTX to treat MCA205 in *Nod2*^{-/-} mice in the absence of ATBs to examine the effects of OMBs on the tumor microenvironment by flow cytometry. One representative experiment is depicted.

(F and G) WT versus *Nod2*^{-/-} crypt-derived 3D small intestine enteroids exposed to mafosfamide or various commensal bacteria, examined by immunohistochemistry using anti-cleaved caspase-3 Ab (F). Percentages of apoptotic IECs in > 10 enteroids examined per condition. (G) Transcriptional levels by qPCR of Lysozyme P, #18, and Bax gene products in the same enteroids.

(H) Immunological effects of CTX in *Nod2*^{fl/fl}; villin-Cre⁺ and *Nod2*^{fl/fl}; villin-Cre⁻ IECs. Statistical analyses were performed by a linear mixed-effects modeling (B), Mann-Whitney (A, C, G, and H), and Dunnett (E and F) tests. All data are expressed as mean ± SEM: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Related to Figure S6.

CD8⁺ T cells using systemic injections of antibodies severely impaired the anticancer efficacy of OMBs against MCA205 (Figure 5H). Thus, these two commensal bacteria have an adjuvant impact on systemic and tumoral immune responses immunomodulated by metronomic CTX.

NOD2 as an Epithelial-Operating Immune Checkpoint for the Adjuvant Effects of OMBs Independently of Ripk2 and Card9

Intrigued by the exacerbated Gram⁺ bacterial translocation and antitumor efficacy of CTX in *Nod1*^{-/-} *Nod2*^{-/-} mice, we analyzed the role of individual NOD receptors in this potentiation. Conditional gene-deleted mice expressing a transgenic recombinase in intestinal epithelial cells under the control of a villin promoter with defective expression of NOD2 (*Nod2*^{fl/fl} villin Cre⁺) and NOD2-expressing wild-type (*Nod2*^{fl/fl} villin Cre⁻) were treated with tamoxifen and orally fed with *E. hirae* right before and after CTX administration prior to sacrifice to analyze the translocation of *E. hirae* in secondary lymphoid organs. The number of *E. hirae* colonies cultivable from mLN and spleens harvested from Cre⁺ mice bearing NOD2 deficiency were markedly increased

compared with Cre⁻ control mice (Figure 6A), indicating that intestinal NOD2 is a gate keeper normally preventing *E. hirae* translocation. The immune-dependent anti-sarcoma effects mediated by CTX were not ameliorated in *Nod1*^{-/-}, *Ripk2*^{-/-}, or *Card9*^{-/-} mice compared with WT counterparts but were markedly enhanced in *Nod2*^{-/-} mice (Figures 6B, S6A, and 6B). Accordingly, we phenocopied these effects using NOD2 receptor agonists, the peptidoglycans muramyl dipeptide inhibiting the antitumor effects of CTX in WT littermates (Figure S6C, left panel) while the TriDAP failed to have any effect (Figure S6C, right panel). Moreover, CTX-treated sarcoma growing in *Nod2*^{-/-} mice contained fewer Treg cells (Figure 6C, left panels) and higher proportions of innate IFN- γ -producing $\gamma\delta$ TILs compared with sarcoma growing in WT counterparts (Figure 6C, right panels). These findings were reminiscent of the bioactivity observed with the "enforced" colonization by *E. hirae* and *B. intestihominis*, respectively, in WT animals. To validate this assumption, we performed a gavage of *Nod2*^{-/-} tumor-bearing mice with each OMB and monitored TILs by flow cytometry (Figure 6D). Both OMBs induced an increase in CD8⁺ CTLs (Figure 6E, left panel), but *E. hirae* increased the CTL/Treg ratio

(Figure 6E, middle panel), whereas the *B. intestinihominis* augmented the proportion of $\gamma\delta$ TILs (Figure 6E, right panel) in *Nod2*^{-/-} tumor-bearing mice.

To analyze the role of NOD2 receptors expressed by intestinal epithelial cells (IECs), we reduced the model system to crypt-derived 3D-small intestine enteroids generated from intestinal stem cells harvested from WT versus *Nod2*^{-/-} mice (Vétizou et al., 2015). While short-term incubation of enteroids with mafosfamide (the active metabolite of the prodrug CTX) at the pharmacologically active concentration did not promote a NOD2-dependent apoptosis of IECs, *E. hirae* and *B. intestinihominis* rapidly induced cell demise of IECs, in a NOD2-dependent manner. Of note, *L. johnsonii* also induced IECs death independently of NOD2 (Figure 6F). Quantitative PCR analyses investigating the transcriptional oscillations of various gene products (IL-18, Bax, but not LysP and Grp78) involved in intestinal homeostasis corroborated the protective role of NOD2 receptors against the toxicity of these immunogenic bacteria (Figure 6G and data not shown) (Nigro et al., 2014).

Finally, conditional knockout mice expressing a transgenic recombinase in IECs under the control of a villin promoter with defective expression of NOD2 confirmed that IECs-associated NOD2 deficiency is necessary and sufficient to account for CTX-induced accumulation of pTh17 and $\gamma\delta$ T cells in the spleens (Figure 6H).

These findings suggest that IEC NOD2 receptors represent “gut immune checkpoints” restricting the immunogenicity of distinct Gram⁺ and Gram⁻ bacteria.

***E. hirae*- and *B. intestinihominis*- Specific Th1 Cell Immune Responses in Chemotherapy-Treated Cancer Patients**

We analyzed the predictive value of preexisting memory CD4⁺ CD45RO⁺ Th1 immune responses directed against Gram⁺ and Gram⁻ bacteria for PFS in 38 advanced lung and ovarian cancer patients. PFS was analyzed regardless of subsequent therapies (Table S3). Culture supernatants of monocytes and memory CD4⁺ T cells were monitored for IFN- γ and IL-10 secretion levels after restimulation with distinct commensals. Segregating the first cohort of lung cancers according to the median of IFN- γ produced by bacteria-specific memory T cells revealed that memory Th1 cells recognizing *E. hirae* and *B. intestinihominis* post-platinum based-chemotherapy predicted longer PFS, while Th1 cell recall responses toward other bacteria were not clinically relevant (Figures 7A and 7B and S7A). A second univariate analysis was performed by adding 13 advanced ovarian cancer patients resistant to platinum-based chemotherapy and treated with metronomic CTX. In this larger cohort, memory Th1 cells directed against *E. hirae* were the only protective T cell responses (Figure 7C). However, considering the ratio between IFN- γ and IL-10 release following stimulation, *B. intestinihominis* allowed to reach statistical significance for prolonged PFS in the whole cohort of advanced cancer patients (Figures 7D and 7E and S7B).

DISCUSSION

Here we identified key bacterial species involved in the immunomodulatory effects of CTX, a major pillar of adjuvanticity used in

a variety of immunotherapeutic protocols (Le et al., 2015; Lee et al., 2015; Sistigu et al., 2011). We showed that bacterial species belonging to two genera, *Enterococcus* and *Barnesiella*, were necessary and sufficient to mount effector and memory cancer-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells, thereby compensating for the loss or limited efficacy of CTX observed during ATBs-or cancer-induced dysbiosis, respectively.

The era of probiotics and microbiotherapy has come of age with the emergence of inflammatory disorders caused by an overt deviation of the gut microbiome (Cotillard et al., 2013; Kasam et al., 2013; Le Chatelier et al., 2013; Moayyedi et al., 2015). Although cancer-associated dysbiosis has not yet been characterized, one can anticipate that the host-microbe mutualism be disturbed in cancer bearers, for instance during chemotherapy-induced mucositis (Zitvogel et al., 2015), IEC-killing during CTLA4 blockade (Beck et al., 2006; Berman et al., 2010; Vétizou et al., 2015) or IEC damage and bacterial translocation during CTX therapy, exacerbated in the context of NOD2 deficiency as shown here. *E. hirae* was capable of decreasing Treg, $\gamma\delta$ T17 cells, and increased CD8⁺ effector TILs, reinstating antitumor CTL activity). Most of the immunological (loss of DC and Th17 subsets) and inflammatory changes (increased proportions of Paneth cells) observed in the lamina propria (LP) during CTX metronomic therapy were observed in the small intestine, primarily in the duodenum and ileum (Viaud et al., 2013) which represent major colonization sites for enterococci (Ghosh et al., 2013). A high density of *E. hirae* (which tolerated gastric conditions and high bile salt concentrations) was found associated with a significant bactericidal effect against enteric pathogens (such as *Vibrio cholerae*, *E. faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, and *Salmonella Typhi*) (Arokiyaraj et al., 2014) and compete against *E. coli*, hereby preventing diarrhea in young kittens (Ghosh et al., 2013). The production of bacteriocins (such as hiraicin JM79) by *E. hirae* facilitated the niche control in the intestine (Nes et al., 2014). However, the consequences of oral feeding with a commensal like *E. hirae* on the equilibrium of the small intestinal ecosystem remain to be elucidated.

Of interest, we found a Gram⁻ bacterium ameliorating the effects of CTX, exerting different immunological effects on systemic and anticancer immune responses than *E. hirae*. Hence, sequencing analyses of feces from mice exhibiting a better response to CTX in the absence of NOD receptors highlighted the overrepresentation of the *Barnesiella* genus at the expense of *Lachnospiraceae* family members. The abundance of *Barnesiella* in the colon correlated with several other immunoregulatory cells such as marginal zone B cells and invariant NKT in the spleen and liver (Presley et al., 2010). The *Barnesiella* genus correlated with the clearance of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in mice (Ubeda et al., 2013). In addition, *Barnesiella* densities were abnormally elevated in HIV-infected compared with non-infected individuals and associated with systemic inflammation (Dinh et al., 2015). Supporting this notion, *B. intestinihominis* was found overrepresented after ionizing radiation causing oxidative DNA damage, a therapeutic context where intestinal microbiota has a protective role (Maier et al., 2014). Here we describe the anticancer immunomodulatory role of *B. intestinihominis*. This Gram⁻ bacterium markedly influenced the abundance of polyfunctional splenic Th1 and Tc1 cells and

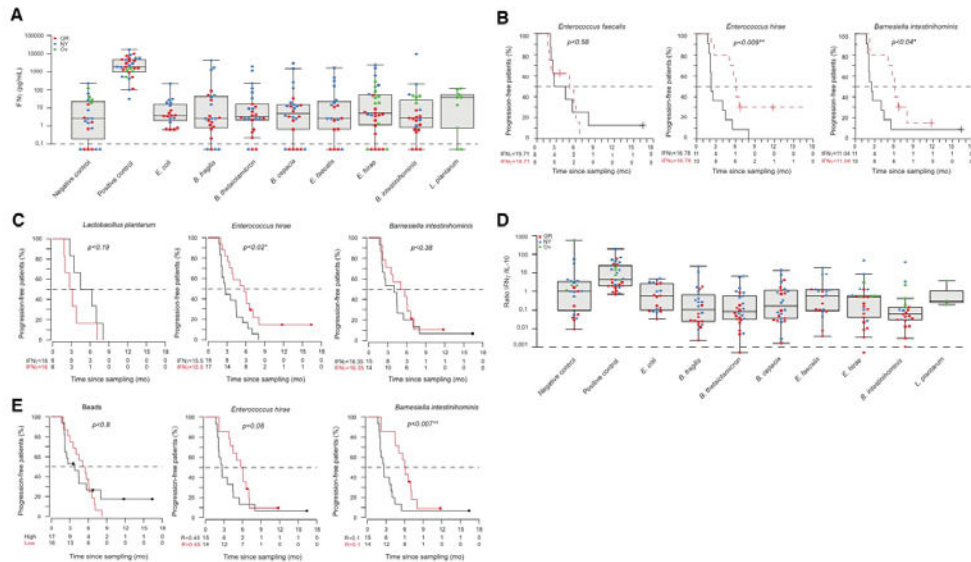


Figure 7. Memory Th1 Immune Responses to *E. hirae* and/or *B. intestihominis* Associated with Prolonged PFS in Cancer Patients
 (A) Raw data for 38 lung and ovarian cancer patients depicting the levels of IFN- γ release (and the mean) determined by ELISA for each patient prior to initiate immunotherapy after various bacterial stimulations of monocytes/CD4⁺CD45RO⁺ T cell cocultures. The univariate analyses and Kaplan Meier curves showing PFS for each subgroup of lung cancer patients above/below this mean are represented for each bacteria (B).
 (C) Addition of 13 ovarian cancer patients to the lung cancer cohort to analyze the predictive value of *E. hirae*-specific Th1 immune responses for prolonged PFS.
 (D) Raw data depicting ratio of IFN- γ /IL-10 determined by ELISA for each patient prior to initiate immunotherapy after various stimulations.
 (E) Stratification according to the mean of the ratios of IFN- γ /IL-10 release in 38 patients. The univariate analyses and Kaplan Meier curves showing PFS for each subgroup of cancer patients above/below this mean ratio of IFN- γ /IL-10 are represented for *E. hirae* and *B. intestihominis*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. GR, Lung cancer treated with CTX-based vaccine; OV, Ovarian cancer on metronomic CTX; NY, Lung cancer on Ipilimumab combined with radiotherapy. Related to Figure S7 and Table S3.

increased the recruitment or proliferation of IFN- γ ⁺ γ δ T cells in TILs, thereby behaving as OMBs with CTX against a wide spectrum of mouse cancers even in the absence of ATBs. The mechanism underlying these immune effects remain unclear, in that in contrast to *E. hirae*, *B. intestihominis* failed to induce IL-12, IL-27, IL-1 β , or Nos2 production by bone marrow DC in vitro.

What could be the mechanisms supporting why such commensals represent suitable OMBs? First, the geodistribution of such commensals might be crucial to enable access by intestinal phagocytes subsets to the immunogenic bacterium. Mucosal (as opposed to luminal) commensals or crypt-residing bacteria might be obvious candidates to regulate local and systemic immune responses (Farache et al., 2013; Palm et al., 2014; Pédrón et al., 2012). Second, the deterministic model proposed by Littman and colleagues for Th cell differentiation in the intestine based on the bacterial context of cognate antigen delivery dictating the fate of antigen-specific T cells might hold true in our context, given the correlation between the capacity of clones of *E. hirae* to mount strong pTh17 immune responses and their OMB effect. *E. hirae* electively induced IL-6, IL-1 β , and IL-23 in ex vivo propagated DC, cytokines involved in the pTh17 differentiation. Indeed, such an inflammatory or immunogenic profile of *E. hirae* 13144 ap-

peared highly protective in cancer patients. End-stage cancer patients resistant to platinum-based chemotherapy exhibited longer PFS when harboring prominent Th1 memory responses directed against *E. hirae* (or *B. intestihominis*). Third, bacterial products might change the immunological tone of lymphoid organs (Ganal et al., 2012) or tumor beds (Iida et al., 2013), facilitating the elicitation of cancer antigen-specific T cells. Hence, Iida et al. exemplified that TLR4 was important for the efficacy of platinum salts in modulating intratumoral MDSC and inducing antitumor effects and demonstrated that LPS could partially compensate for the reduced tumoricidal activity of oxaliplatin in ATB-treated mice (Iida et al., 2013). Fourth, given that some bacteria (such as *E. hirae* and *B. intestihominis*) are electively kept in check by NOD2 receptors, it is conceivable that loss-of-function mutations of NOD2 gene and impaired expression of NOD2 gate keepers in pathological circumstances will facilitate the elicitation of immune responses against these commensals/pathobionts. Fifth, bacteria-specific adaptive immune responses primed in mesenteric LN might express an array of chemokine receptors that dictate their homing to inflammatory lesions to reinstate local immunity (Bartman et al., 2015; Viaud et al., 2013). Hence, interruption of the CCR9/CCL25 axis promoted the growth of CCL25 producing

tumors by limiting the accumulation of CD4⁺ Th cells in tumor draining lymph nodes (Jacquetot et al., 2016). Finally, a potential molecular mimicry between distinct commensals/pathobionts and tumor antigens is conceivable but remains to be established (Rubio-Godoy et al., 2002).

This study represents the rationale to reconstitute an optimal microbiota diversity integrating important species of the *Enterococcus* and *Barnesiella* genera to optimize the response to at least alkylating agents, currently employed in breast cancers, sarcomas, hematopoietic and pediatric malignancies. Altogether, these findings open the perspective of developing OMBs or their bacterial products (MAMPS or metabolites) to optimize cancer therapies (Zitvogel et al., 2015) and open the question as to whether any OMB could fit any cytotoxicant. We surmise that the near future will undoubtedly unravel new OMBs suitable for other therapeutic compounds with their peculiar mode of action.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice

All animal experiments were carried out in compliance with the French and European laws and regulations. Mice were used between 7 and 16 weeks of age. WT specific pathogen-free C57BL/6J mice were obtained from Harlan (France) and were kept in SPF conditions in the animal facility of Gustave Roussy, Villejuif, France. *Nod1*^{-/-}, *Nod2*^{-/-}, and *Nod1*^{-/-}*Nod2*^{-/-} C57BL/6J mice were kindly provided by I. Gomperts Boneca (Institut Pasteur, Paris). *Nod2 Villin-cre* and *Ripk2*^{-/-} C57BL/6J by M. Chamallard (Institut Pasteur, Lille), and *Card9*^{-/-} C57BL/6J by H. Sokol (Hôpital Saint Antoine, Paris). Mice were maintained in sterile isolators.

Tumor Challenge and Treatment

0.8–1 × 10⁶ MCA205, MC38-OVA^{dim}, MCA205-OVA, or 0.5 × 10⁶ TC-1 and Ret tumor cells were inoculated subcutaneously in the right flank. When tumors reached a size of 20 to 40 mm² (day 0), mice were injected weekly i.p. with 100 mg/kg of cyclophosphamide (CTX, Endoxan, Baxter provided by GRCC) or NaCl. For tumor rechallenge in the settings of OVA vaccination, mice were inoculated with 3 × 10⁶ MC38-OVA^{dim}. Tumor size was routinely monitored by means of a caliper. In villin-Cre-conditional KO mice experiments, tamoxifen was provided by CM. Mice were injected i.p. with 50 mg/kg of tamoxifen 1 month before use. MDP and TriDAP (Invivogen) were injected i.p., at a dose of 100 µg per mouse. Neutralization experiments: In experiments using anti-IL-17 (clone 17F3, 200 µg per mouse) or anti-IFN-γ (clone R4-6A2, 200 µg per mouse) mAb, antibodies (or their isotype controls (MOPC-21 or HRPN, respectively)) were injected i.p. twice a week from the beginning of the experiment until the final injection of cyclophosphamide. In order to deplete CD8⁺ T cells, clone 53-6.72 (200 µg per mouse) or isotype control 2A3 were injected i.p. twice a week from the beginning of the experiment until the final injection of cyclophosphamide. All mAb were obtained from BioXcell (West Lebanon, NH, USA).

Gut Colonization with Dedicated Bacterial Species

Colonization of ATBs pre-treated or naive C57BL/6 mice was performed by oral gavage with 100 µl of suspension containing 1 × 10⁹ bacteria. Efficient colonization was confirmed by culture of feces 48 hr post-gavage. Fecal pellet contents were harvested and resuspended in BHI+15% glycerol at 0.1 g/ml. Serial dilutions of feces were plated onto sheep's blood agar plates (COS, Biomérieux) and incubated for 48h at 37°C with 5% CO₂ in aerobic or anaerobic conditions. After 48 hr, single colonies were isolated and Gram staining was performed. The identification of specific bacteria was accomplished through the combination of morphological tests and analysis by means of an Andromas MALDI-TOF mass spectrometer (Andromas, France). *Barnesiella intestihominis* was kindly provided by D.R. *E. coli* MC1061, *E. faecalis* JH2-2 and *L. plantarum* NCIMB8826 were kindly provided by I.G.B. *Lactobacillus johnsonii* and *Enterococcus hirae* isolates used in the experiments were originally isolated from spleens or mesenteric lymph nodes of SPF mice treated with CTX.

Alternate *E. hirae* isolates were provided by V.C. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus johnsonii*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecalis* JH2-2, and *Barnesiella intestihominis* were all grown on COS plates for 48 hr at 37°C in anaerobic conditions. *Escherichia coli* was grown on COS plates for 24h at 37°C in aerobic conditions. Bacteria were harvested from the agar plates, suspended in sterile NaCl at an optical density (600 nm) of 1, which corresponds approximately to 1 × 10⁹ colony-forming units (CFU)/ml, centrifuged, washed once, and then resuspended in sterile NaCl. For bacteria reconstitution experiments using mice previously treated with ATBs, ATBs treatment was stopped after 2 weeks, mice were then treated with CTX and were orally gavaged with 1 × 10⁹ CFU the following day. For bacteria reconstitution experiments using mice not-treated with ATBs, mice were orally gavaged with 1 × 10⁹ CFU and treated with CTX the following day.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes six figures, three tables, and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.009>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.Z. conceived the study, analyzed the data, provided the intellectual guidance, and wrote the paper with G.K.'s editing. R.D., M.V., N.J., T.Y., B.R., S.R., C.F., N.W., M.P.R., C.P.M.D., S.B., V.P.-C., V.C., L.A., and C.J. performed experiments and analyzed data. D.E. and P.L. analyzed bioinformatics data. D.R., M.C., I.G.B., P.L., H.S., V.C., and E.T. provided mice, bacteria, and reagents. A.E., E.C., P.-L.W., M.C., V.C., and I.G.B. also provided intellectual guidance. M.P., M.M., J.-C.S., E.G., S.F. were in charge of patients enrollment for clinical trials.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank patients who participated to this study. R.D. and M.V. were supported by La Ligue contre le cancer, G.K. and L.Z. were supported by the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipes labellisées), European Research Council Advanced Investigator Grant (to G.K.), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Institut National du Cancer (INCa), Fondation de France, the LabEx Immuno-Oncology, the SIRIC Stratified Oncology Cell DNA Repair and Tumor Immune Elimination (SOCRATE); the SIRIC, and the Paris Alliance of Cancer Research Institutes (PACRI), ISREC, and Swiss Bridge Foundation. S.F. was supported by NIH (R01 CA161879 P1). M.C. was supported by the FRM (DEQ20130326475) and INCa (Pbio-2012-106). NW was a recipient of a postdoctoral fellowship from Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-BSV3-0014-01). L.Z., M.C., P.L., and I.G.B. are all sponsored by Association pour la Recherche contre le cancer (PGA120140200851). V.C. was supported by the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche, the Institut de veille sanitaire (InVS), and the Interreg IVA France (Manche) - Angleterre (Risk Manche). We are grateful to the staff of the animal facility of Gustave Roussy and Institut Pasteur. We thank K. LeRoux (INRA) for technical help. We thank M.J. Smyth for the MC38-OVA^{dim}. Thanks to Professor Quinn, Professor Amant, and Ms. Silvers for clinical support and Dr. Tuyraerts for processing some of the PBMC and the Anti-Cancer Fund. M.M. is a recipient of a Monash PhD Scholarship and MP an NHMRC SRF Award. P.R. has been supported by DFG CE Inflammation at Interfaces, the European Union's FP7/2007-2013 under grant agreement n°305564 (SysmedIBD) and the SFB1182 TP C2. G.K., A.E., and L.Z. are the founders of the biotech company EverImmune.

Received: July 27, 2015
Revised: June 28, 2016
Accepted: July 22, 2016
Published: October 4, 2016

REFERENCES

Arokiyaraj, S., Hairul Islam, V.I., Bharanidharan, R., Raveendar, S., Lee, J., Kim, D.H., Oh, Y.K., Kim, E.-K., and Kim, K.H. (2014). Antibacterial,

- anti-inflammatory and probiotic potential of *Enterococcus hirae* isolated from the rumen of *Bos primigenius*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 2111–2118.
- Bartman, C., Chong, A.S., and Alegre, M.-L. (2015). The influence of the microbiota on the immune response to transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 20, 1–7.
- Beck, K.E., Blansfield, J.A., Tran, K.Q., Feldman, A.L., Hughes, M.S., Royal, R.E., Kammula, U.S., Topalian, S.L., Sherry, R.M., Kleiner, D., et al. (2006). Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. *J. Clin. Oncol.* 24, 2283–2289.
- Berman, D., Parker, S.M., Siegel, J., Chasalow, S.D., Weber, J., Galbraith, S., Targan, S.R., and Wang, H.L. (2010). Blockade of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 by ipilimumab results in dysregulation of gastrointestinal immunity in patients with advanced melanoma. *Cancer Immun.* 10, 11.
- Blaser, M. (2011). Antibiotic overuse: Stop the killing of beneficial bacteria. *Nature* 476, 393–394.
- Cotillard, A., Kennedy, S.P., Kong, L.C., Prifti, E., Pons, N., Le Chatelier, E., Almeida, M., Quinquis, B., Levenez, F., Galleron, N., et al.; ANR MicroObes consortium (2013). Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 500, 585–588.
- Dinh, D.M., Volpe, G.E., Duffalo, C., Bhalchandra, S., Tai, A.K., Kane, A.V., Wanke, C.A., and Ward, H.D. (2015). Intestinal microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection. *J. Infect. Dis.* 211, 19–27.
- Farache, J., Zigmund, E., Shakhari, G., and Jung, S. (2013). Contributions of dendritic cells and macrophages to intestinal homeostasis and immune defense. *Immunol. Cell Biol.* 91, 232–239.
- Ganal, S.C., Sanos, S.L., Kallfass, C., Oberle, K., Johner, C., Kirschning, C., Lienenklaus, S., Weiss, S., Staeheli, P., Aichele, P., and Diefenbach, A. (2012). Priming of natural killer cells by nonmucosal mononuclear phagocytes requires instructive signals from commensal microbiota. *Immunity* 37, 171–186.
- Ghosh, A., Borst, L., Stauffer, S.H., Suyemoto, M., Moisan, P., Zurek, L., and Gookin, J.L. (2013). Mortality in kittens is associated with a shift in ileum mucosa-associated enterococci from *Enterococcus hirae* to biofilm-forming *Enterococcus faecalis* and adherent *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3567–3578.
- Gur, C., Ibrahim, Y., Isaacson, B., Yamin, R., Abed, J., Gamliel, M., Enk, J., Bar-On, Y., Stanietsky-Kaynan, N., Copenhagen-Glazer, S., et al. (2015). Binding of the Fap2 protein of *Fusobacterium nucleatum* to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. *Immunity* 42, 344–355.
- Iida, N., Dzutsev, A., Stewart, C.A., Smith, L., Bouladoux, N., Weingarten, R.A., Molina, D.A., Salcedo, R., Back, T., Cramer, S., et al. (2013). Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science* 342, 967–970.
- Jacquelot, N., Enot, D.P., Flament, C., Vimond, N., Blattner, C., Pitt, J.M., Yamazaki, T., Roberti, M.P., Dailière, R., Vétizou, M., et al. (2016). Chemokine receptor patterns in lymphocytes mirror metastatic spreading in melanoma. *J. Clin. Invest.* 126, 921–937.
- Kassam, Z., Lee, C.H., Yuan, Y., and Hunt, R.H. (2013). Fecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 108, 500–508.
- Le, D.T., Wang-Gillam, A., Picozzi, V., Greten, T.F., Crocenzi, T., Springett, G., Morse, M., Zeh, H., Cohen, D., Fine, R.L., et al. (2015). Safety and survival with GVAX pancreas prime and *Listeria Monocytogenes*-expressing mesothelin (CRS-207) boost vaccines for metastatic pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* 33, 1325–1333.
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.-M., Kennedy, S., et al.; MetaHIT consortium (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500, 541–546.
- Lee, D.W., Kochenderfer, J.N., Stetler-Stevenson, M., Cui, Y.K., Delbrook, C., Feldman, S.A., Fry, T.J., Orentas, R., Sabatino, M., Shah, N.N., et al. (2015). T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 385, 517–528.
- Louis, P., Hold, G.L., and Flint, H.J. (2014). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 661–672.
- Maier, I., Berry, D.M., and Schiessler, R.H. (2014). Intestinal microbiota reduces genotoxic endpoints induced by high-energy protons. *Radiat. Res.* 181, 45–53.
- Moayyedi, P., Surette, M.G., Kim, P.T., Libertucci, J., Wolfe, M., Onischi, C., Armstrong, D., Marshall, J.K., Kassam, Z., Reinisch, W., and Lee, C.H. (2015). Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* 149, 102–109.e6.
- Nes, I.F., Diep, D.B., and Ike, Y. (2014). Enterococcal Bacteriocins and Antimicrobial Proteins that Contribute to Niche Control. In *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, M.S. Gilmore, D.B. Clewell, Y. Ike, and N. Shankar, eds. (Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary).
- Nigro, G., Rossi, R., Commere, P.-H., Jay, P., and Sansonetti, P.J. (2014). The cytosolic bacterial peptidoglycan sensor Nod2 affords stem cell protection and links microbes to gut epithelial regeneration. *Cell Host Microbe* 15, 792–798.
- Palm, N.W., de Zoete, M.R., Cullen, T.W., Barry, N.A., Stefanowski, J., Hao, L., Degnan, P.H., Hu, J., Peter, I., Zhang, W., et al. (2014). Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell* 158, 1000–1010.
- Paulos, C.M., Wrzesinski, C., Kaiser, A., Hinrichs, C.S., Chieppa, M., Cassard, L., Palmer, D.C., Boni, A., Muranski, P., Yu, Z., et al. (2007). Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self-tumor-specific CD8⁺ T cells via TLR4 signaling. *J. Clin. Invest.* 117, 2197–2204.
- Pédron, T., Mulet, C., Dauga, C., Frangeul, L., Chervaux, C., Grompone, G., and Sansonetti, P.J. (2012). A crypt-specific core microbiota resides in the mouse colon. *MBio* 3, 3.
- Presley, L.L., Wei, B., Braun, J., and Borneman, J. (2010). Bacteria associated with immunoregulatory cells in mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 936–941.
- Rossini, A., Rumio, C., Sfondrini, L., Tagliabue, E., Morelli, D., Miceli, R., Mariani, L., Palazzo, M., Ménard, S., and Balsari, A. (2006). Influence of antibiotic treatment on breast carcinoma development in proto-neu transgenic mice. *Cancer Res.* 66, 6219–6224.
- Rubio-Godoy, V., Dutoit, V., Zhao, Y., Simon, R., Guillaume, P., Houghten, R., Romero, P., Cerottini, J.-C., Pinilla, C., and Valmori, D. (2002). Positional scanning-synthetic peptide library-based analysis of self- and pathogen-derived peptide cross-reactivity with tumor-reactive Melan-A-specific CTL. *J. Immunol.* 169, 5696–5707.
- Rutkowski, M.R., Stephen, T.L., Svoronos, N., Allegrezza, M.J., Tesone, A.J., Perales-Puchalt, A., Brenicova, E., Escovar-Fadul, X., Nguyen, J.M., Cadungog, M.G., et al. (2015). Microbially driven TLR5-dependent signaling governs distal malignant progression through tumor-promoting inflammation. *Cancer Cell* 27, 27–40.
- Sandoval, F., Terme, M., Nizard, M., Badoual, C., Bureau, M.F., Freyburger, L., Clement, O., Marcheteau, E., Gey, A., Fraisse, G., et al. (2013). Mucosal imprinting of vaccine-induced CD8⁺ T cells is crucial to inhibit the growth of mucosal tumors. *Sci. Transl. Med.* 5, 172ra20.
- Sears, C.L., and Garrett, W.S. (2014). Microbes, microbiota, and colon cancer. *Cell Host Microbe* 15, 317–328.
- Sistigu, A., Viaud, S., Chaput, N., Bracci, L., Proietti, E., and Zitvogel, L. (2011). Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design. *Semin. Immunopathol.* 33, 369–383.
- Sivan, A., Corrales, L., Hubert, N., Williams, J.B., Aquino-Michaels, K., Earley, Z.M., Benyamin, F.W., Lei, Y.M., Jabri, B., Alegre, M.-L., et al. (2015). Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* 350, 1084–1089.
- Ubeda, C., Bucci, V., Caballero, S., Djukovic, A., Toussaint, N.C., Equinda, M., Lipuma, L., Ling, L., Gouborne, A., No, D., et al. (2013). Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization. *Infect. Immun.* 81, 985–973.

- Velicer, C.M., Heckbert, S.R., Lampe, J.W., Potter, J.D., Robertson, C.A., and Taplin, S.H. (2004). Antibiotic use in relation to the risk of breast cancer. *JAMA* 291, 827–835.
- Vétizou, M., Pitt, J.M., Daillère, R., Lepage, P., Waldschmitt, N., Flament, C., Rusakiewicz, S., Routy, B., Roberti, M.P., Duong, C.P.M., et al. (2015). Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* 350, 1079–1084.
- Viaud, S., Saccheri, F., Mignot, G., Yamazaki, T., Daillère, R., Hannani, D., Enot, D.P., Pfirschke, C., Engblom, C., Pittet, M.J., et al. (2013). The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science* 342, 971–976.
- Vingert, B., Adotevi, O., Patin, D., Jung, S., Shrikant, P., Freyburger, L., Eppolito, C., Sapoznikov, A., Amessou, M., Quintin-Colonna, F., et al. (2006). The Shiga toxin B-subunit targets antigen in vivo to dendritic cells and elicits anti-tumor immunity. *Eur. J. Immunol.* 36, 1124–1135.
- Zitvogel, L., Galluzzi, L., Viaud, S., Vétizou, M., Daillère, R., Merad, M., and Kroemer, G. (2015). Cancer and the gut microbiota: an unexpected link. *Sci. Transl. Med.* 7, 271ps1.

Supplemental Information

Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis

Facilitate Cyclophosphamide-Induced Therapeutic

Immunomodulatory Effects

Romain Daillère, Marie Vétizou, Nadine Waldschmitt, Takahiro Yamazaki, Christophe Isnard, Vichnou Poirier-Colame, Connie P.M. Duong, Caroline Flament, Patricia Lepage, Maria Paula Roberti, Bertrand Routy, Nicolas Jacquelot, Lionel Apetoh, Sonia Becharef, Sylvie Rusakiewicz, Philippe Langella, Harry Sokol, Guido Kroemer, David Enot, Antoine Roux, Alexander Eggermont, Eric Tartour, Ludger Johannes, Paul-Louis Woerther, Elisabeth Chachaty, Jean-Charles Soria, Encouse Golden, Silvia Formenti, Magdalena Plebanski, Mutsa Madondo, Philip Rosenstiel, Didier Raoult, Vincent Cattoir, Ivo Gomperts Boneca, Mathias Chamaillard, and Laurence Zitvogel

Supplemental Information

Patients and cohorts' characteristics. The four clinical studies were conducted after written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. Patient characteristics are detailed in Table S3. Four cohorts of patients diagnosed with stage III/IV non-small cell lung cancer (NSCLC) or ovarian cancer were utilized to set up the median of IFN γ secretion levels of memory CD4⁺ T cells to distinct bacterial species. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) for selection of memory CD4⁺ T cells and monocytes were provided by Gustave Roussy Cancer Campus (Villejuif, France), by the Department of Radiation Oncology (New York University, New York, NY, USA) and the Department of Immunology and Pathology of Monash University, Victoria, Australia).

Clinical studies. **1.** Phase II vaccine trial immunizing cancer patients (diagnosed with inoperable NSCL after induction with four cycles of platinum-based chemotherapy) with autologous DC-derived exosomes and CTX (Study code « Dex2 »: NCT01159288) (Besse et al., 2015). Eligible patients required at least stabilization of their disease prior to be on maintenance immunotherapy with sc injections of IFN γ - dendritic cell derived-exosomes loaded with MHC class I and class II-restricted cancer antigens. PBMCs were collected at baseline after the 4th cycle of platinum-based chemotherapy, before metronomic cyclophosphamide followed by exosome injections and were kept frozen at -80°C. Response to treatment was assessed with computed tomography scan after week 9th. **2.** Phase II study in stage IV NSCLC patients combining ipilimumab (anti-CTLA4 Ab) at 3mg/kg intravenously every 3 weeks for 4 doses with radiotherapy for the assessment of abscopal effects (Study code: NCT02221739). Eligible patients were chemotherapy refractory NSCLC with at least 2 measurable sites of disease. Before the first therapeutic injection, PBMCs were collected and frozen at -80°C. Patients were re-imaged (CT scan) between days 81-88 and evaluated for responses in the non-irradiated measurable metastatic sites. **3.** Bicentric, phase II trial in patients with advanced stage treatment refractory gynecological tumors. Patients received oral doses of 50 mg of CTX twice daily for 3 consecutive days. Treatment cycles were repeated at fortnightly intervals for up to 8 cycles (Alfred Hospital, application number 2014000305). **4.** Gustave Roussy ovarian cancer patients with recurrent disease were treated with bevacizumab (recombinant humanized monoclonal IgG antibody against VEGF) 7.5 mg/kg intravenously D#1 and D#14 , then every 3 weeks plus 50 mg daily oral cyclophosphamide until disease

Supplemental Information

progression or unacceptable toxicity. CA 125 was performed at every visit with a physical examination to evaluate progression that was then assessed on a CT scan.

ATB treatments. Mice were treated with ATB 2 weeks before manipulation and continued on antibiotics until the end of the experiment unless mono-associated with distinct bacterial species. A mix of ampicillin (1 mg/ml), streptomycin (5 mg/ml), and colistin (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich) were added in sterile drinking water. Solutions and bottles were changed 3 times a week. Antibiotic activity was confirmed by macroscopic changes observed at the level of caecum (dilatation) and by cultivating the fecal pellets resuspended in BHI+15% glycerol at 0.1g/ml on blood agar plates (COS, Biomérieux) for 48h at 37°C in aerobic or anaerobic conditions.

Generation of Nod2 villin-cre mice. Nod2-floxed mice carrying the conditional allele were obtained by homologous recombination of a targeting vector in 129Sv/Pas embryonic stem (ES) cells in collaboration with Genoway (France). The targeting vector contained two loxP sites (intron 1 and intron 3), flanking the exons 2 and 3, which carry the canonical and the cryptic ATG start codons. Inside the floxed region a neomycin selection cassette was introduced which was flanked by FRT sites. Injection of recombined ES cells into blastocysts yielded several loxP/FRT+ chimeras, which were further bred to C57BL/6J mice to achieve germline transmission. Agouti pups of the F1 generation were characterized further and led to the identification of a heterozygous founder, which was further crossbred to C57BL/6J. Later, the neo-cassette was excised using a FLP-recombinase expressing line, yielding the final floxed allele. Nod2 - floxed mice were subsequent crossed with villin-cre mice that were kindly provided by Dr S. Robine.

Cell culture and reagents. MCA205 WT, MCA205-OVA, MC38-OVA^{dim}, TC-1 and Ret cell lines (syngeneic from C57BL/6J mice) were cultured at 37°C under 5% CO₂ in RPMI 1640 containing 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 UI/ml penicillin/streptomycin, 1 mM sodium pyruvate and MEM non-essential amino acids (henceforth referred to as complete RPMI-1640), all reagents being purchased from Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. OVA expressing MCA205 cells were selected in complete

Supplemental Information

RPMI-1640 medium (as described above) supplemented with 50 µg/ml hygromycin B (Invitrogen, Life Technologies™).

Flow cytometry analyses. Spleen were harvested seven days after the first injection of CTX in naïve mice. Tumors and spleens were harvested ten days after the first injection of CTX in tumor-bearing mice. Excised tumors were cut into small pieces and digested in RPMI medium containing Liberase™ at 25 µg/mL (Roche) and DNase1 at 150 UI/mL (Roche) for 30 minutes at 37°C. The mixture was subsequently passed through a 100 µm cell strainer. 2×10^6 splenocytes (after red blood cell lysis) or tumor cells were preincubated with purified anti-mouse CD16/CD32 (clone 93; eBioscience) for 15 minutes at 4°C, before membrane staining. For intracellular staining, the Foxp3 staining kit (eBioscience) was used. Dead cells were excluded using the Live/Dead Fixable Yellow dead cell stain kit (Life Technologies™). Anti-mouse antibodies for CD3ε (145-2C11), CXCR3 (CXCR3-173), CD4 (GK1.5), CD8α (53-6.7), IL-17 (eBio17B7), IFNγ (XMG1.2), CD45.1 (A20), CD45.2 (104), CCR6 (140706), CD25 (PC61.5.3), KI67 (FITC mouse anti-human KI67 set), TNF-α (MP6-XT22), Foxp3 (FJK-16s), CD44 (IM7), CD62L (MEL-14) and γδT (UC7-13D5) were obtained from BD, BioLegend, eBioscience and R&D. For cytokine staining, cells were stimulated for 4 hrs at 37°C with 50ng/ml of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Calbiochem), 1 µg/ml of ionomycin (Sigma), and BD Golgi STOP™ (4 µL/6 mL, BD Biosciences). To detect anti-OVA₂₅₇₋₂₆₄/K^b- or anti-E7₄₉₋₅₇/D^b-specific CD8⁺ T cells, cells were purified by anti-CD8α⁺ T cell isolation kit microbeads (Miltenyi Biotec, Germany). Purified CD8⁺ T cells from the spleen were stained with anti-OVA₂₅₇₋₂₆₄/K^b- or anti-E7₄₉₋₅₇/D^b-specific tetramers according to the manufacturer's recommendations (Immudex, Denmark). Briefly, cells were incubated at 4°C with the PE-labeled tetramers for 10 minutes. After incubation and washes, labeled anti-CD8α mAbs (53-6.7) were used to phenotype the tetramers⁺CD8⁺ T cells. Naive non immunized mice were also included as negative controls for these experiments. Stained samples were acquired on a Canto II (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) or on a Cyan ADP 9 colours (Beckman Coulter) cytometers and analyses were performed with FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Microbiota composition and diversity. Total DNA was extracted from fecal and mucosal samples (~50-100 mg) as previously described (Lepage et al., 2005; Seksik et al., 2003) using both physical and

Supplemental Information

chemical lysis. DNA concentration was spectrophotometrically determined using a Nanodrop instrument (Thermo Scientific). Microbiota composition was deeply analyzed using IonTorrent sequencing targeting the 16S rDNA V3-V5 region (For16S_519: 5' CAGCMGCCGCGGTAATAC 3', Rev16S_926: 5' CCGTCAATTCMTTGGAGTTT 3'). Library preparations for amplicons sequencing were performed in a final volume of 100 μ L containing 1X PCR buffer, 2 mM MgSO₄, 1 U of DNA High Fidelity Taq Polymerase (Invitrogen), 625 nM of each barcoded primer (IDT), 250 μ M of each dNTP (Invitrogen) and a concentration-adjusted DNA sample. A total of 45 DNA samples were amplified and bidirectional libraries were sequenced through PGM, IonTorrent (Life Technologies) with Ion 318™ Chip and Ion PGM™ 400 Sequencing Kit (Life Technologies) following the recommended protocol. Feces (n=19) were sampled from both WT (n=9) and DKO (n=10) mice treated either with CTX (n=10) or PBS as control (n=9). Ileal mucosa was scraped and samples from 26 animals were collected (n=6 WT-CTX; n=6 WT-PBS; n=7 DKO-CTX and n=7 DKO-PBS). A total of 4 665 013 reads were obtained, trimmed for adaptors and PCR primers removal and stringently binned for a minimal sequence length of 200 bases, a maximal sequence length of 600 bases, a maximum homopolymers length of 5, and a minimal base quality threshold set at 15. Finally, 250 529 sequences were further studied with an average of 4 646 reads/fecal sample and 6 240 reads/mucosal sample. Using QIIME (Caporaso et al., 2010), sequences were further clustered in at 97% of identity in OTUs using cdhit (Li and Godzik, 2006) and representative sequences were assigned to different taxonomic levels (from phylum to genus) using the RDP database (release 11.3). OTUs were assigned to closest taxonomic neighbors and relative bacterial species using SEQMATCH and up-to-date 16S rRNA gene RDP database. Estimates of phylotypes richness and diversity were calculated using both Shannon and Simpson indices on the rarefied OTU table. All statistical analyses were performed using R program and ade4 package (Package ade4; <http://pbil.univ-lyon1.fr/ADE-4/>). Wilcoxon test was applied to assess statistical significance in bacterial composition between the different samples. Based on inter-class PCA, statistical p-values of the link between the different mice groups and bacterial genus microbial profiles was assessed using a Monte-Carlo rank test (1000 replicates). The Monte-Carlo test is a multivariate and non parametric test based on random permutations. It takes a small (relative to the total number of permutations) random sample of the possible replicates and test the null hypothesis that there

Supplemental Information

are no significant differences in genus distribution between the different defined groups. When the Monte-Carlo test p-value is less than 0.05, one can confidently reject the null hypothesis that observed distribution between different classes is due to random observation.

Bacterial translocation, cultivation and identification. Mesenteric lymph nodes and spleens were aseptically removed, smashed in NaCl and plated onto blood agar plates (COS, BioMérieux), for aerobic and anaerobic growth. After 48h of culture, single colonies were isolated, identified and stocked in glycerol at -80°C. The identification of specific bacteria was accomplished through the combination of morphological tests and analysis by means of an Andromas MALDI-TOF mass spectrometer (Andromas, France).

Cytokine and antimicrobial peptide quantification. IL-6 and IL-12 (BD Biosciences), IL-1 β and IL-23 (eBiosciences) were measured by ELISA following the manufacturer's instructions. For quantification of lipocalin-2 (Lcn-2) from feces and caecum contents, individual (not pooled) samples were reconstituted in PBS containing 0.1% Tween 20 (at 100 mg/ml) and vortexed for 10-20 min to obtain a homogenous fecal suspension. These samples were then centrifuged for 10 min at 10,000 rpm. Clear supernatants were collected and stored at -20°C until analysis. Lcn-2 levels were determined in the supernatants using the DuoSet murine Lcn-2 ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) following the manufacturer's instructions.

Immunization of mice. Therapeutic immunization. TC-1 bearing C57BL/6 mice pre-treated with broad spectrum ATBs for 2 weeks were immunized by intraperitoneal injections (100 μ L) at day 3 post-CTX with the vaccine STxB-E7 (20 μ g) in α GalCer (1 μ g) adjuvant. **Prophylactic setting.** C57BL/6J mice pre-treated with broad spectrum ATBs or colistin alone for 2 weeks were immunized by footpad inoculation (50 μ L) at day 3 post-CTX with the vaccine composed of OVA protein (1 mg) in poly I:C (50 μ g) adjuvant.

Adoptive cell transfer. CD45.2⁺ CD4⁺T cells from OTII transgenic C57BL/6J mice were purified using a cocktail of biotin-conjugated antibodies against CD8 α , CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, MHC-class II, Ter-119 and TCR $\gamma\delta$ as primary labeling reagent. The cells were

Supplemental Information

then magnetically labeled with anti-biotin MicroBeads (Miltenyi Biotec, France). Flow cytometry confirmed that greater than 95% of cells were CD4⁺ T cells. 1×10^6 CD4⁺ T cells were adoptively transferred iv into CD45.1⁺ recipient C57BL/6 mice.

Characterization of CXCR3⁺ cells by real-time quantitative PCR Analysis. Total RNA from CXCR3⁺ CD4⁺ T cells cell-sorted from *E. hirae* vs NaCl gavaged C57BL/6 mice was extracted with TriReagent (Ambion), reverse transcribed using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) and was analyzed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) with SYBR Green method according to the manufacturer's instructions using the 7500 Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems). Expression was normalized to the expression of mouse beta-actin (*Actb*).

Primers	Sequence (5'-3')
<i>Actb</i> – F	ATGGAGGGGAATACAGCCC
<i>Actb</i> – R	TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT
<i>Tbx21</i> – F	ATCCTGTAATGGCTTGTGGG
<i>Tbx21</i> – R	TCAACCAGCACCCAGACAGAG
<i>Ifng</i> – F	TGAGCTCATTGAATGCTTGG
<i>Ifng</i> – R	ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT
<i>Il21</i> – F	AAAACAGGCCAAAAGCTGCAT
<i>Il21</i> – R	TGACATTGTTGAACAGCTGAAA
<i>Cxcr3</i> – R	TCTCGTTTTCCCCATAATCG
<i>Cxcr3</i> – F	AGCCAAGCCATGTACCTTGA

Bacterial strains and antimicrobial susceptibility testing. A set of 26 isolates of *E. hirae* originated from different sources were included in the study: 12 human strains, 8 environmental strains, 5 murine strains, and the type strain CIP 53.48^T. All strains were accurately identified to the species level by using the MALDI-TOF mass spectrometry technology (Microflex LT, Bruker Daltonics, Bremen, Germany), as previously described (Fang et al., 2012). The minimum inhibitory concentrations (MICs) of ampicillin, gentamicin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, pristinamycin, levofloxacin,

Supplemental Information

vancomycin, teicoplanin, tetracycline, tigecycline, chloramphenicol, and linezolid were determined by the broth microdilution method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013).

Molecular typing by rep-PCR. Clonal relatedness and diversity within the *E. hirae* species was evaluated using the repetitive sequence-based PCR (rep-PCR), which uses primers that target non-coding repetitive sequences interspersed in bacterial genomes. DNA was extracted directly from colonies using the semi-automated NucliSens easyMAG platform (BioMérieux, Marcy-L'Etoile, France) according to the manufacturer's instructions. DNA amplification was performed using the DiversiLab Enterococcus DNA Fingerprinting Kit (BioMérieux), as described previously (Bourdon et al., 2011). The rep-PCR amplicons were separated with microfluidics chips (LabChip device; Caliper Technologies, Inc.) and a 2100 Agilent bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, Calif.). Profiles were analyzed using the web-based DiversiLab software (version 3.4), which uses the Pearson correlation coefficient to calculate pairwise similarities between all the samples tested. The discriminant threshold was calculated by the software.

Biofilm formation and *Galleria mellonella* infection model. The level of biofilm production was assessed for strains 13144 (murine isolate), 708 (human isolate), 13152 (environmental isolate), EH17 (human isolate), and 10815 (CIP53.48^T type strain) as previously described (Lebreton et al., 2012). Biofilm was stained with 1% crystal violet and measurement of optical density was made at 580 nm using a microplate reader (Multiskan Ascent, Thermo Electron Corporation). Each assay was performed in triplicate in at least three independent experiments. The strain *Enterococcus faecium* HM1070 Δ *asrR* was used as positive control (Lebreton et al., 2012). The pathogenicity of strains 13144 (murine isolate), 13152 (environmental isolate), 13344 (murine isolate), and CIP53.48^T (type strain) was evaluated after infection of *Galleria mellonella* larvae, as previously described (Lebreton et al., 2009). Briefly, larvae were infected subcutaneously using a syringe pump (KD Scientific, Holliston, MA) with *E. hirae* strains ($1.7 \times 10^6 \pm 0.3 \times 10^6$ CFU per larva) in 10 μ l of sterile saline buffer with a sterilized microsyringe and incubated at 35°C. Larval killing was then monitored at 24, 48, and 72 h post-infection. For one test, 10 insects were used and the experiments were repeated at least three times. *E. faecium* HM1070 and

Supplemental Information

Enterococcus faecalis JH2-2 were used as nonvirulent and virulent controls, respectively (Lebreton et al., 2009) .

Quantification of bacterial colonisation after oral feeding with *E. hirae*. DNA was extracted from 60 murine intestinal tissues using the QIAmp DNA Stool Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations and total DNA concentration was spectrophotometrically determined for each sample by using a Nanovue instrument (GE Healthcare, USA). The samples were first subjected to PCR amplification of the murine glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene using specific primers (Utikal et al., 2009). Then, amounts of *E. hirae* were determined by quantitative PCR experiments using the SsoAdvanced universal SYBR green supermix kit and a CFX Connect real-time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories). DNA levels in each sample were determined by absolute quantification using serial dilutions of PCR products with specific primers for the *murG* gene of *E. hirae* (Arias et al., 2006). For normalization, the total bacterial load was also estimated by qPCR using a set of universal primers for 16S rDNA amplification (Kennedy et al., 2014) and the relative proportion of *E. hirae* was calculated for each sample. Each experiment was performed in triplicate.

Primers	Sequence (5'-3')	Source or reference
<i>GAPDH-F</i>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	(Utikal et al., 2009)
<i>GAPDH-R</i>	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	(Utikal et al., 2009)
<i>murG-hir-F</i>	GGCATATTTATCCAGCACTAG	(Arias et al., 2006)
<i>murG-hir-R</i>	TAGCGTACGAAAAGGCATCC	This study
<i>UniF</i>	GTGSTGCAYGGYYGTCGTCA	(Kennedy et al., 2014)
<i>UniR</i>	ACGTCRTCCMCNCTTCCTC	(Kennedy et al., 2014)

Assessing CD4⁺ T cell memory responses directed against commensals. Frozen PBMC obtained before specific therapy (see clinical studies above) were thawed, washed and resuspended in the recommended separation medium (RoboSep Buffer; STEMCELL Technologies) for magnetic bead separation. Monocytes were enriched from 2×10^6 PBMC (EasySep™ Human Monocyte Enrichment Kit, STEMCELL Technologies) and resuspended in RPMI-1640 (GIBCO Invitrogen), 10% human AB+

Supplemental Information

serum (Jacques Boy) supplemented with 2 mmol/L glutamine (GIBCO Invitrogen), GM-CSF (1000 UI/mL, Miltenyi), without any antibiotics. Monocytes were seeded in 96-well round bottom plates at 5×10^3 cells/well either alone, in the presence of one of the seven selected bacterial strains (*Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecalis*, *Barnesiellia intestinhominis*, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Burkholderia cepacia*) at a multiplicity of infection (MOI) of 100, or with LPS (1 µg/mL, Sigma) plus sCD40L (1 µg/mL, Miltenyi) as positive control and incubated for 1 hour at 37°C, 5% CO₂. During incubation, the remaining autologous PBMC fractions were enriched for memory CD4⁺ T cells (EasySep™ Human Memory CD4 Enrichment Kit, STEMCELL Technologies). The enriched CD4⁺CD45RO⁺ T cells were washed, counted and resuspended at 5×10^4 /well in RPMI-1640, 10% human AB+ serum, 2 mmol/L glutamine, 20 UI/mL rIL-2 (Proleukin), 1% penicillin/streptavidin (PEST; GIBCO Invitrogen) and 50 µg/ml of gentamycin (GIBCO Invitrogen). CD4⁺CD45RO⁺ T cells were also incubated alone, or with CD3/CD28 beads (1 µL/mL, Dynabeads T-Activator, Invitrogen) as negative and positive controls respectively. Monocytes and memory CD4⁺CD45RO⁺ T cell enrichment was confirmed as being >98% pure by flow cytometry. Monocyte-bacteria/ CD4⁺CD45RO⁺ T cell co-cultures were incubated for 48 hours at 37°C, 5% CO₂. Supernatants were harvested, cleared by centrifugation (1200 rpm, 5 min) and stored at -20°C for determination of IFN γ or IL-10, as measured by commercial ELISA or Luminex MagPix technology (Biorad).

Fluorescent *in situ* hybridization. Intestinal tissue was fixed in freshly prepared Methacarn solution, subsequently incubated in methanol and toluene and embedded in paraffin. 7 µm-thick tissue sections were dewaxed in toluene, washed in 95 % ethanol, and air-dried at RT. Tissue sections were pre-treated with proteinase K (MACHEREY-NAGEL) and lysozyme (Amresco), and hybridization (20 mM Tris-HCl, 0.9 M NaCl, 0.1 % SDS, pH 7.4) was performed overnight at 45°C by applying the general bacterial probe Eub338 labeled with Cy3 and the Cy3-labeled probe Enc221, specific for the genus *Enterococcus*, at a concentration of 5 ng/µl (Amann et al., 1990; Wellinghausen et al., 2007). Non-specific probe binding was removed by washing slides in hybridization buffer and washing buffer (20 mM Tris-HCl, 0.9 M NaCl, pH 7.4). DAPI was used for nuclear counterstaining and tissue sections were covered with ProLongR Gold Antifade reagent (Life Technologies). Microscopic evaluation was performed by using

Supplemental Information

the Axio Imager Z1 microscope, Axiovision software (all Zeiss), and ImageJ software (Schneider et al., 2012).

Histological staining procedures. Tissue was fixed in 4% neutral buffered formaldehyde solution for 24h, dehydrated through a series of graded alcohol and toluene, and embedded in paraffin. 5 μ m-thick tissue sections have been placed on Superfrost Plus slides (Thermo Scientific), incubated for 10 min at 60°C and rehydrated through a series of graded alcohol and distilled water. For immunohistochemistry, endogenous peroxidases were inactivated by incubating tissue sections with 3% hydrogen peroxide for 10 min at RT. Antigen retrieval was performed in citrate buffer (10 mM, pH 6) by steaming sections in a microwave oven for 20 min. Tissue sections were blocked with 5% BSA/PBS for 30 min at RT and primary antibodies against Muc2 (1:200, sc15334, Santa Cruz Biotechnology) and Lysozyme (1:1000, A0099, Dako) were applied for 1h at RT and overnight at 4°C, respectively. Secondary antibodies (1:200, UP511380, INTERCHIM UPTIMA; 1:200, A11008, Life Technologies) were incubated for 1h at RT. Muc2-specific signals were visualized by using 3.3'-diaminobenzidine solution (BD Pharmingen) followed by nuclear counterstain with hemalaun. For immunofluorescence staining, nuclear counterstain was performed with DAPI. Tissue sections were covered by using ProLongR Gold Antifade reagent (Life Technologies). Microscopic analyses were performed by using the Zeiss Axioplan 2 imaging microscope, Axio Imager Z1 microscope, Axiovision software (all Zeiss), and ImageJ software (Schneider et al., 2012).

Isolation of intraepithelial cells (IELs) from small intestine. The small intestine was harvested and Peyer's patches were removed, as well as all fat residue and intestinal content. Intestines were cut longitudinally and transversally into pieces of 1-2 cm length. Fragments were then transferred to 50 mL conical tubes, vortexed and shaken for 30 minutes at 37°C in PBS containing 5% FCS, 5 mM EDTA and 1 mM DTT. The suspension was then passed through a 100 μ m cell strainer (BD) and pelleted by centrifugation. Fragments remaining on the cell strainer were collected and digested again. Cell pellets were resuspended in RPMI containing 10% FCS. The cells were then either stained for flow cytometry analysis or resuspended in RLT⁺ buffer for gene expression analysis.

Supplemental Information

Priming of BM-DCs. Bone marrow-derived dendritic cells (BM-DCs) were generated from femurs and tibiae of C57BL/6 mice, cultured for 8 days in Iscove's medium (Sigma-Aldrich) with J558 supernatant (containing 40 ng/ml of GM-CSF), 10% FCS, 100 IU/ml penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamin, 50 μ M 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) and split every 3-4 days. At day 8, BM-DCs were infected with the isolated bacterial strains at a MOI (multiplicity of infection) 1:10 for 1 h at 37°C in the appropriate medium without antibiotics. Then, cells were washed with PBS and incubated in complete medium supplemented with gentamicin (50 μ g/ml) to kill extracellular bacteria. After 24h, culture supernatants from BM-DCs were assayed for cytokine secretion. BM-DCs were resuspended in RLT⁺ buffer for gene expression analysis.

Gene expression analysis of IELs and BM-DCs by quantitative RT-PCR. Total RNA extraction and genomic DNA removal were performed with the Rneasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. 1 μ g of total RNA was then reverse transcribed into cDNA with the SuperScript III Reverse Transcriptase and the RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Life Technologies, Saint Aubin, France), in the presence of random primers (Promega, Charbonnieres, France) and the Deoxynucleoside Triphosphate Set, PCR grade (Roche Diagnostics, Meylan, France). Expression of *Nos2* and *RegIIIg* was analyzed with TaqMan® Gene Expression Assays using the Universal Master Mix II on a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies, France). Amplifications were carried out using the following ramping profile: 1 cycle at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 sec, 60°C for 1 min. Quantitative RT-PCR data were normalized to the expression levels of the housekeeping gene Beta-2-Microglobulin (*B2m*) by means of the 2^{- Δ Ct} method.

Primers	References
<i>Nos2</i>	Mm00440502_m1
<i>B2m</i>	Mm00437762_m1
<i>RegIIIg</i>	Mm00441127_m1

Supplemental Information

Small intestine crypt isolation and enteroid culture. Crypt isolation and organoid cultures were performed as previously described (Sato et al., 2009) with the following modifications. Briefly, the ileum of 10-13 week old mice were cut longitudinally and scraped with a cover slip to remove villi. The intestine was cut transversely into 2-4 mm pieces and washed 4 times with cold PBS. Fragments were then incubated in 2 mM EDTA in PBS for 30 minutes on ice. Following the removal of EDTA medium, fragments were vigorously resuspended in PBS containing 10% FCS (Gibco) and passed through a 70 μ M strainer (BD Bioscience). This step was repeated 3 times. Isolated crypts were pelleted and washed in Advanced DMEM/F12 (ADF) (Invitrogen). Crypts were then resuspended in 1 mL of Matrigel growth factor reduced basement membrane matrix (Corning) and 50 μ L drops were placed into pre-warmed 24-well plates. Following Matrigel polymerisation, crypts were overlaid with ADF supplemented with 100 U/mL penicillin G sodium, 100 μ g/mL streptomycin sulphate, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 1x N2 supplement, 1x B27 supplement, 50 ng/mL mEGF, 100 ng/mL mNoggin (Peprotech, Hamburg, Germany), *N*-acetylcysteine (Sigma) (reagents from Invitrogen unless otherwise indicated) and 10% conditioned medium of R-Spondin-1 transfected HEK 293T cells. Media was changed every 2-3 days. Cultures were split every 7-10 days by first dissolving the matrigel with cold ADF and mechanically disrupting the organoids using a narrowed Pasteur pipette.

Culture of enteroids with mafosfamide and bacteria. Organoids were incubated in presence of mafosfamide (25 μ g/mL) O/N. 10×10^6 bacteria were then added for 1 hour at 37°C in the appropriate medium without antibiotics. Gentamicin (50 μ g/ml) was then added to the media in order to kill extracellular bacteria. One hour later, media was replaced by complete media and incubated for 24 hours. Half of the enteroids embedded in matrigel were formalin fixed for immunohistochemistry and half were resuspended in RLT⁺ reagent for gene expression analysis

Enteroids gene expression analysis. Enteroids were lysed in 250 μ l of RLT buffer and total RNA was extracted by using the column-based RNeasy Mini Kit (Qiagen). Complementary DNA was generated by using the AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's instructions. Quantification of gene expression was performed on Stratagene™

Supplemental Information

Mx3005P by using the Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (both Agilent Technologies) and gene-specific primers (Eurogentec).

<i>Gene</i>	Forward	Reverse
<i>β-Actin</i>	5'-TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT-3'	5'-ATGGAGGGGAATACAGCCC-3'
<i>LysP</i>	5'-GATGGCTACCGTGGTGTC-3'	5'-AGCTCGTGTGTTATAATTGCTCTC-3'
<i>III8</i>	5'-TTTATACCTGAAGAAAATGGAGACCTG-3'	5'-AAGTCGGCCAAAGTTGTCTGAT-3'
<i>Bax</i>	5'-CGTGGTTGCCCTCTTCTACT-3'	5'-CCAGCCACAAAGATGGTCAC-3'

Formalin-fixed paraffin-embedded blocks (FFPE) of enteroids. Enteroids derived from the ileum of mice were fixed in 10% neutral buffered formalin for 4h. Enteroids were then transferred to Mini-Micro Flow cassettes, paraffin embedded with a Tissue-Tek® VIP® 6 Vacuum Infiltration Processor (Sakura) and cut into 3 µm-thick sections.

Immunohistochemistry staining of cleaved caspase 3 expression. FFPE organoids sections were deparaffinised and rehydrated through a series of graded alcohols and distilled water. Antigen retrieval was performed by pre-treating sections with 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0, Diapath) for 30 min in a 98°C water bath. Endogenous peroxidase activity was inhibited by treating sections with 3% hydrogen peroxidase (#S202386, DAKO) for 10 min. Sections were blocked with IHC/ISH Super Blocking (#PV6122, LeicaBiosystem) for 10 min. The primary polyclonal Rabbit antibody (Ab), Cleaved Caspase-3 (Asp175) (#9661, Cell Signalling, 1µg/mL) was incubated for 1h, followed by the secondary Ab, PowerVision Poly-HRP anti-Rabbit IHC Detection Systems (#PV6114, LeicaBiosystem) for 20 minutes. Peroxidases were detected with Di Amino Benzidine-peroxidase substrate kit (DAKO), and counterstained with Mayer's haematoxylin. *Counting of cleaved caspase 3 positive cells.* At 400X magnification in all fields, cleaved caspase 3 positive cells and the total number of cells were counted on 2 levels for each condition. Counting was replicated at least twice.

Statistics. Data were analyzed with Microsoft Excel (Microsoft Co., Redmont, WA, USA), Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA), and R. Data are presented as means ± SEM where applicable. Interferential analyses was conducted with Dunnett or Mann-Whitney tests. Incidences in tumor-tree

Supplemental Information

mice and translocation were compared with Firth's penalized-likelihood logistic regression modelling. Tumor growth was subjected to a linear mixed effect modelling applied to log pre-processed tumor surfaces. The *p*-values were calculated by testing jointly whether both tumor growth slopes and intercepts were dissimilar between treatment groups of interests. All reported tests are two-tailed and were considered significant at *p*-values < 0.05. Statistical analyses pertaining to 16S rRNA gene amplicons sequencing are detailed in supplemental material. PFS was defined from the enrollment date in the trials to the progression or death. Patients were followed up to 18 months. PFS curve were estimated by the Kaplan-Meier product-limit method and their distributions were compared by Cox regression after stratification on the median calculated on available data for each cytokine.

Supplemental References

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., and Stahl, D.A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* *56*, 1919–1925.

Arias, C.A., Robredo, B., Singh, K.V., Torres, C., Panesso, D., and Murray, B.E. (2006). Rapid identification of *Enterococcus hirae* and *Enterococcus durans* by PCR and detection of a homologue of the *E. hirae* mur-2 Gene in *E. durans*. *J. Clin. Microbiol.* *44*, 1567–1570.

Besse, B., Charrier, M., Lapierre, V., Dansin, E., Lantz, O., Planchard, D., Chevalier, T.L., Livartoski, A., Barlesi, F., Laplanche, A., et al. (2015). Dendritic Cell-derived Exosomes as Maintenance Immunotherapy after First Line Chemotherapy in NSCLC. *OncoImmunology* *0*, 00–00.

Bourdon, N., Lemire, A., Fines-Guyon, M., Auzou, M., Périchon, B., Courvalin, P., Cattoir, V., and Leclercq, R. (2011). Comparison of four methods, including semi-automated rep-PCR, for the typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J. Microbiol. Methods* *84*, 74–80.

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* *7*, 335–336.

Supplemental Information

Clinical and Laboratory Standards Institute (2013). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 23rd informational supplement. CLSI M100-S23.

Fang, H., Ohlsson, A.-K., Ullberg, M., and Ozenci, V. (2012). Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK 2 system for the identification of clinical *Enterococcus* isolates. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* *31*, 3073–3077.

Kennedy, N.A., Walker, A.W., Berry, S.H., Duncan, S.H., Farquarson, F.M., Louis, P., Thomson, J.M., UK IBD Genetics Consortium, Satsangi, J., Flint, H.J., et al. (2014). The impact of different DNA extraction kits and laboratories upon the assessment of human gut microbiota composition by 16S rRNA gene sequencing. *PLoS One* *9*, e88982.

Lebreton, F., Riboulet-Bisson, E., Serror, P., Sanguinetti, M., Posteraro, B., Torelli, R., Hartke, A., Auffray, Y., and Giard, J.-C. (2009). *ace*, Which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by *Ers* and is involved in virulence. *Infect. Immun.* *77*, 2832–2839.

Lebreton, F., van Schaik, W., Sanguinetti, M., Posteraro, B., Torelli, R., Le Bras, F., Verneuil, N., Zhang, X., Giard, J.-C., Dhalluin, A., et al. (2012). *AsrR* is an oxidative stress sensing regulator modulating *Enterococcus faecium* opportunistic traits, antimicrobial resistance, and pathogenicity. *PLoS Pathog.* *8*, e1002834.

Lepage, P., Seksik, P., Sutren, M., de la Cochetière, M.-F., Jian, R., Marteau, P., and Doré, J. (2005). Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD. *Inflamm. Bowel Dis.* *11*, 473–480.

Li, W., and Godzik, A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *22*, 1658–1659.

Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., et al. (2009). Single *Lgr5* stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* *459*, 262–265.

Supplemental Information

Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.

Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R., and Doré, J. (2003). Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 52, 237–242.

Utikal, J., Maherali, N., Kulalert, W., and Hochedlinger, K. (2009). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J. Cell Sci.* 122, 3502–3510.

Wellinghausen, N., Bartel, M., Essig, A., and Poppert, S. (2007). Rapid identification of clinically relevant Enterococcus species by fluorescence in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3424–3426.

Supplemental Figure Legends

Figure S1. Related to Figure 1. Quality control of bacterial quantification and localization after oral feeding with *E. hirae* 13144. (A) *E. hirae* localization determined by qPCR in different anatomic samples from naïve mice. Data were obtained by DNA amount ratio determination with a set of specific primers that amplified the murG gene of *E. hirae* and a set of universal primers used to determine the total bacterial load. (B-C) FISH analyses of bacterial *E. hirae* niching in the small intestine (B) and colon (C). FISH was performed on 7 µm-thick colonic tissue sections. Enc221-positive bacteria were found in the luminal content (right panels) of *E. hirae*-monoassociated mice, but not in ATBs-treated controls. No positive signals were observed in the inner mucus layer of mice. Scale bars represent 100 µm (left) and 20 µm (right). (D) Quantification of bacterial colonisation after oral feeding with *E. hirae*, each dot representing one mouse. Feces were cultivated on blood agar plates and after 48h of culture, single colonies were isolated, identified through the combination of morphological tests and analysed by means of a mass spectrometer (log scale).

Figure S2. Related to Figure 2. Biological variability of different *E. hirae* isolates. (A) *Th1* polarisation of CD4⁺ T cells following mono-association with *E. hirae*. Flow cytometric analysis of

Supplemental Information

CD4⁺ T cell splenocytes allowed to identify the percentages of CXCR3⁺ cells in the gate of live CD4⁺ splenocytes. (B) *Transcription levels of the Ifng, Tbx21 and Il21 gene products in CXCR3⁺ CD4⁺ cell-sorted T cells* by real-time quantitative PCR analysis, each dot representing one mouse (log scale). Statistical analyses were performed by Mann-Whitney test. All data are expressed as mean ± SEM: **p*<0.05. (C) *Clonal relationship analysis of 26 E. hirae isolates collected from different sources*. Profiles obtained after rep-PCR and analysis on DiversiLab software (bioMerieux, France). Non supervised hierarchical clustering of the sequence similarities among these clones. Clone 13144-13147 have been isolated in the Gustave Roussy animal facility from murine splenocytes after different kind of therapies (CTX or CTLA4 blockade, respectively). The one isolate that has been used henceforth or above is « 13144 ». (D) *Virulence of E. hirae isolates in G. mellonella infection model*. Percent survival of *G. mellonella* larvae at 24, 48, and 72 h after infection with the strains of *E. hirae*. *E. faecium* HM1070 and *E. faecalis* JH2-2 were used as nonvirulent and virulent control strains, respectively. Ten insects were used per test (with ca. 1.7 × 10⁶ per larva) and experiments were repeated at least three times. Results represent the mean ± SD of live larvae. (E). *Production of biofilm in E. hirae isolates*. Level of biofilm production after crystal violet staining (optical density measured at 580 nm) for strains 13144 (murine isolate), 708 (human isolate), 13152 (environmental isolate), EH17 (human isolate) and 10815 (CIP53.48^T type strain). The strain *E. faecium* HM1070 Δ *asrR* was used as positive control. Each assay was performed in triplicate. Data are represented as mean ± SEM.

Figure S3. Related to Figure 2. Cytokine release by BM-DC exposed to commensal oncobiotics: role of NOD2. Day 8 GM-CSF differentiated mouse DC derived from WT versus *Nod2*-deficient mice were incubated for 1 hour with live bacteria (*L. johnsonii*, *B. intestinihominis*, various strains of *E. hirae*) at a 10 :1 MOI, then inactivated by ATBs and harvested at 24 hrs. ELISA monitoring of pTh17- (A) or Th1-related (B) cytokines in the supernatants. Triplicate wells for two independent experiments are shown. Statistical analyses were performed by Mann-Whitney test. NT : Not-treated ; *B. intest. Barnesiella intestinihominis* ; *L. john* : *L.johnsonii*. All data are expressed as mean ± SEM: **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

Figure S4. Related to Figure 4. Differential representativity of commensal genera in mucosal and

Supplemental Information

luminal contents post-CTX in WT versus NOD DKO mice. (A). *Variations at the level of bacterial families.* Details of the families residing in feces significantly under- or overrepresented in NaCl -treated groups comparing WT versus *Nod1^{-/-};*x*Nod2^{-/-}* (DKO) mice. (B) *Principle component analysis of the pyrosequencing of 16S rRNA of gene amplicons from ileums of CTX-treated WT versus *Nod1^{-/-};*x*Nod2^{-/-}* mice.* Mucosa of ileum have been harvested at day 7 post-CTX inoculation in 5 naive C57BL/6 mice. The *p* value showing significant results between PBS and CTX therapies for gene deficient mice is indicated on the graphs. (C) Details of the families residing in ileum significantly under- or overrepresented in NaCl (left panel) and CTX (right panel) treated groups comparing WT versus DKO mice. Statistical analyses were performed by Mann-Whitney test. All data are expressed as mean ± SEM: **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

Figure S5. Related to Figure 5. Systemic immune effects of OMBs. (A and E). *Experimental settings.* Administration of oncobiotics in naïve in the absence of ATBs. Flow cytometric determination of the proportions of CD4⁺ and CD8⁺ T cells into the CD3⁺ T cell gate (B, left and middle panels) and percentages of effector cells among CD8⁺ T cells (B, right panel), as well as the pTh17 (C) and polyfunctional Th1 and Tc1 cells (D) after gavage with each oncobiotic. (E and F). MCA205 spontaneous growth kinetics in the absence of CTX. A typical graph representative of at least two independent experiments comprising more than 5 animals/group is shown. Statistical analyses were performed by Dunnett (B and D) and Mann-Whitney (C) tests as well as a linear mixed-effects modelling (F). All data are expressed as mean ± SEM: **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

Figure S6. Related to Figure 6. Efficacy of CTX against sarcomas in various genetic or pharmacological conditions. CTX was administered every 7 days at 100 mg/kg ip in WT mice, CARD9 (A) or RIP2 (B) - deficient mice. (C). Effects of NOD1 and NOD2 agonists on the CTX-induced antitumor effects. One representative tumor growth curve out of two is depicted. Each graph depicts the means of 5 mice/group in one representative growth kinetics. Statistical analyses were performed by a linear mixed-effects modelling. All data are expressed as mean ± SEM: ****p*<0.001.

Figure S7. Related to Figure 7. Progression free survival curves according memory Th1 CD4⁺ T cell recall responses to commensals in end stage NSCLC patients after chemotherapy.

Supplemental Information

Determination by ELISA of cytokine release after 48 hrs of restimulation of CD4⁺CD45RO⁺ T cells with monocytes loaded with various commensals. Survival curves were estimated by the Kaplan-Meier product-limit method and survival distribution compared by Cox regression, according to the mean of IFN γ release of the whole cohort (A) or the mean of the IFN γ /IL-10 ratio (B).

Table S1. Related to Figure 2. Antimicrobial susceptibility testing (expressed as MICs in mg/L) of different *E. hirae* isolates. MIC (minimum inhibitory concentration) were established using the broth microdilution method as recommended by the CLSI guidelines. All experiment were performed in triplicate.

Table S2. Related to Figure 4. Specific bacterial phylotypes (1st relative isolates) impacted by CTX inbetween WT versus *Nod*-deficient animals. Sequencing of fecal and mucosal microbiota harvested from CTX treated-WT versus *Nod1*^{-/-}:*Nod2*^{-/-} naïve C57BL/6J mice. Taxonomic affiliation of these isolates is also shown (genus levels when available or closer taxonomic rank).

Table S3. Related to Figure 7. Patient characteristics for the study of memory T cell response as a predictor to immunotherapy. Baseline characteristics of patients used for *in vitro* stimulation.

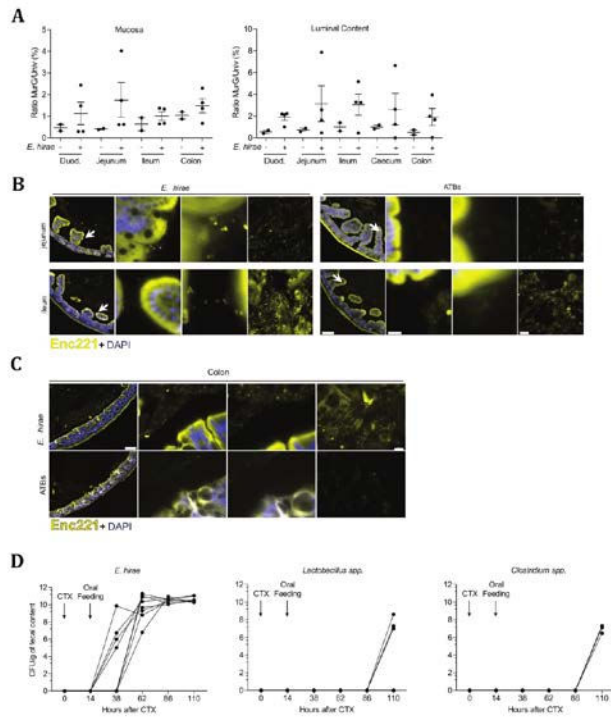


Figure S1, Daillère et al., Immunity

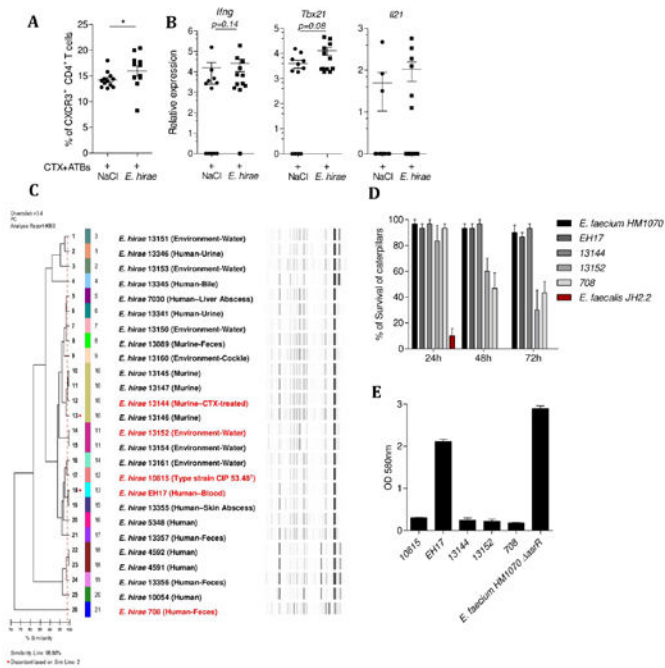


Figure S2, Daillère et al., Immunity

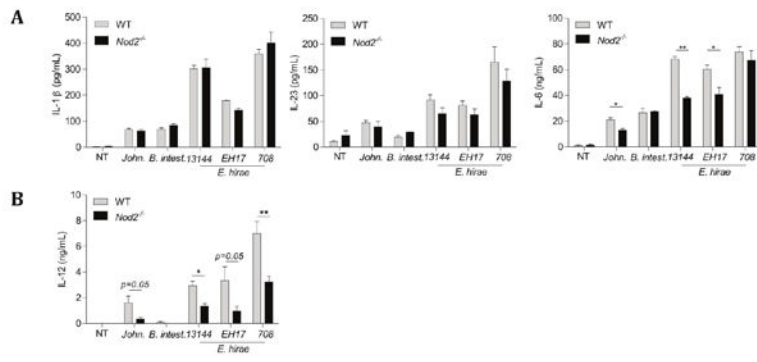


Figure S3, Daillère et al., Immunity

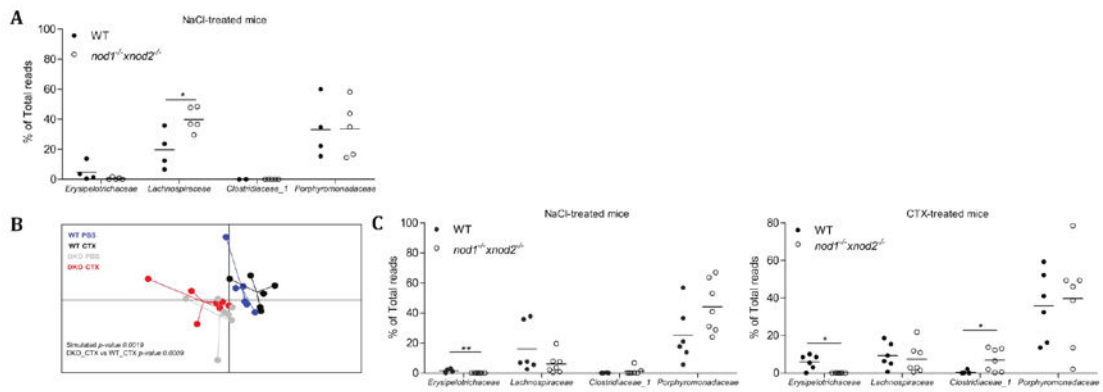


Figure S4, Daillère et al., Immunity

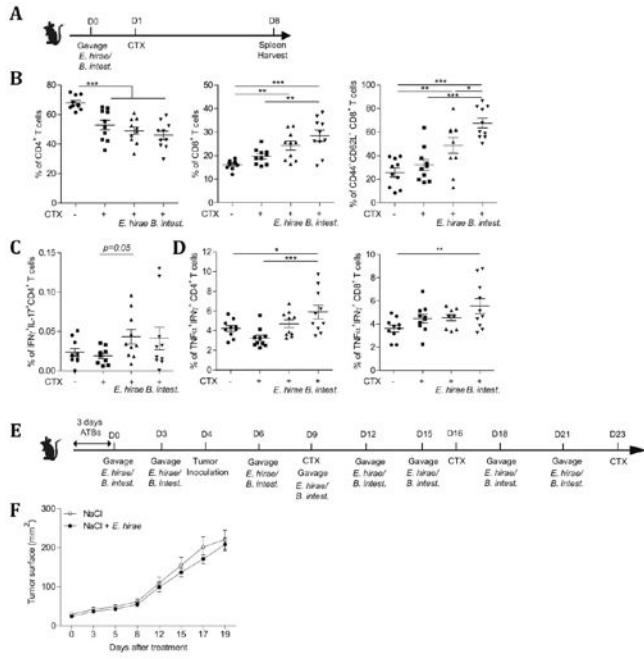


Figure S5, Daillère et al., Immunity

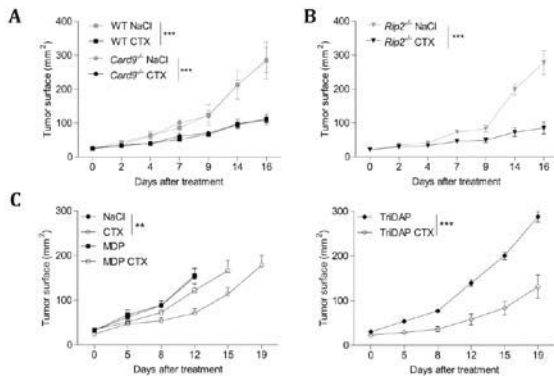
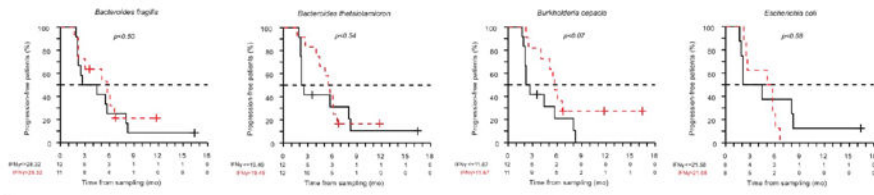


Figure S6, Daillère et al., Immunity

A



B

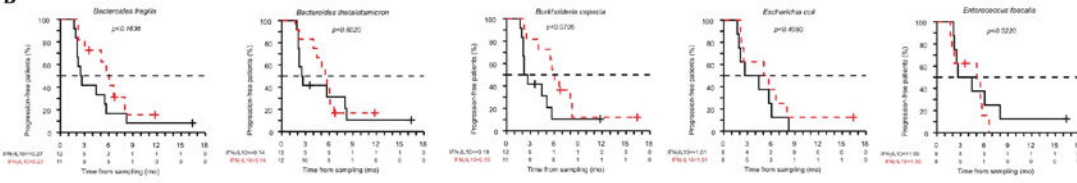


Figure S7, Daillère et al., Immunity

	Ampicillin	Chloramphenicol	Clindamycin	Erythromycin	Gentamicin	Levofloxacin	Linezolid	Pristinamycin	Streptomycin	Tetracycline	Tigecycline	Teicoplanin	Vancomycin
10815	0,5	4	0,03	0,03	8	0,25	8	0,03	128	0,12	0,03	0,12	0,5
13144	0,25	8	4	0,03	4	0,5	8	0,03	32	0,25	0,03	0,03	0,25
13152	NC	NC	8	0,03	NC	0,03	NC	0,03	64	NC	0,03	0,03	1
EH17	0,08	4	2	0,03	8	1	4	0,12	32	0,25	0,08	4	0,25

Table S1, Daillère et al., Immunity

FECES	1st isolate sequence name	Genus	Mean				p-value (t-test)		
			WT_CTX	WT	DKO_CTX	DKO	WT_CTX vs WT	DKO_CTX vs DKO	WT_CTX vs DKO_CTX
Increased in DKO_CTX	Gram-negative bacterium cTPY-13; AY239461	unclassified_“Porphyromonadaceae”	3,548	0.003	21,396	5,188	0,374	0,020	0,016
	Gram-negative bacterium cL10-2b-4; AY239469	Barnesiella	0,002	0,000	7,907	0,669	0,374	0,002	0,003
	Barnesiella intestihominis (T); YIT 11860; AB370251	Barnesiella	6,410	4,997	8,890	3,839	0,696	0,027	0,335
	Gram-negative bacterium cL10-2b-4; AY239469	Barnesiella	1,392	1,105	5,437	0,534	0,868	0,041	0,092
	Gram-negative bacterium cL10-2b-4; AY239469	Barnesiella	0,148	0,003	2,773	0,485	0,383	0,047	0,032
	Gram-negative bacterium cL10-2b-4; AY239469	Barnesiella	0,431	1,263	1,844	0,382	0,274	0,004	0,005
	Porphyromonas sp. MI10-1288x; HM583587	Porphyromonas	1,102	1,225	1,968	0,565	0,880	0,007	0,173
	Gram-negative bacterium cL10-2b-4; AY239469	Barnesiella	0,865	2,466	1,632	0,321	0,412	0,001	0,075
	Gram-negative bacterium cL10-2b-4; AY239469	Barnesiella	0,711	0,501	1,708	0,567	0,643	0,018	0,079
	Alloprevotella rava; F0323; GU470887	Alloprevotella	0,489	1,706	1,062	0,155	0,534	0,020	0,298
	Parasutterella excrementihominis (T); YIT 11859	Parasutterella	0,490	0,384	0,964	0,120	0,772	0,004	0,085
	Gram-negative bacterium cL10-2b-4; AY239469	Barnesiella	0,391	0,457	0,900	0,282	0,862	0,022	0,163
	Lactobacillus murinus; ONS2; AY324630	Lactobacillus	0,194	0,404	0,430	0,036	0,408	0,048	0,226
	Gram-negative bacterium cTPY-13; AY239461	unclassified_“Porphyromonadaceae”	0,019	0,000	0,265	0,036	0,374	0,038	0,031
	segmented filamentous bacterium; X77814	unclassified_Clostridiaceae 1	0,000	0,000	0,199	0,000	na	0,038	0,038
	Gram-negative bacterium cL10-2b-4; AY239469	Barnesiella	0,016	0,035	0,080	0,007	0,540	0,032	0,048
	Barnesiella sp. 177; KJ572412	Barnesiella	0,057	0,025	0,087	0,024	0,266	0,018	0,253
Decreased in DKO_CTX	Clostridium aldense (T); RMA 9741; DQ279736	Clostridium XIVa	0,262	0,059	0,045	1,047	0,140	0,015	0,113
	Clostridium sp. Culture Jar-8; AB622825	Clostridium IV	0,223	0,210	0,000	0,300	0,947	0,037	0,259
	Clostridium sp. Clone-17; AB622837	unclassified_Lachnospiraceae	0,022	0,010	0,000	0,152	0,454	0,015	0,145
	Clostridium sp. ASF356; ASF 356; AF157052	Clostridium XIVb	0,148	0,100	0,034	0,155	0,580	0,033	0,105
	Clostridium populeti (T); ATCC 35295; X71853	Clostridium XIVa	0,000	0,019	0,000	0,095	0,391	0,012	na
	unidentified bacterium; CCCM41; AY654953	unclassified_Lachnospiraceae	0,060	0,112	0,008	0,100	0,633	0,003	0,070
	Clostridium sp. ASF502; ASF 502; AF157053	unclassified_Lachnospiraceae	0,039	0,065	0,000	0,044	0,700	0,036	0,312
	Clostridium oresticum; type strain: DSM 1287; 6; FR749922	Clostridium XIVa	0,054	0,006	0,000	0,033	0,250	0,029	0,199
	Oscillibacter sp. G2; HM626173	Oscillibacter	0,022	0,013	0,005	0,033	0,609	0,048	0,247

Characteristics of the Patients	n=38	%
Age		
Mean age-yr	64	
Range –yr	24-87	
Gender		
Male	12	31.6
Female	26	68.4
Lung cancer subtypes n=25		
Adenocarcinoma	20	52.6
Squamous cell carcinoma	3	7.9
Sarcomatoid carcinoma	1	2.6
Large cell neuroendocrine carcinoma	1	2.6
Ovarian cancer subtypes n=13		
Ovarian carcinoma	9	23.7
Papillary serous cystadenocarcinoma	2	5.3
Malignant mixed Müllerian tumor	1	2.6
Peritoneal tumor	1	2.6
Disease stage		
III	6	15.8
IV	32	84.2
Prior therapies		
Chemotherapy	38	100
Immune checkpoint inhibitor	0	0
Treatment post sampling		
CTX-based treatment	27	71.1
Ipilimumab/Radiotherapy	11	28.9

Table S3, Daillère et al., Immunity

ILEUM									
Increased in DKO_CTX	segmented_filamentous_bacterium_X77814	unclassified_Clostridiaceae_1	0,386	0,058	6,913	1,248	0,402	0,053	0,030
	Clostridium_sp_ID4_AY960571	Allobaculum	0,000	0,000	0,016	0,001	na	0,041	0,029
Decreased in DKO_CTX	Barnesiella_intestinibominis_YIT_11860_AB370251	Barnesiella	8,331	5,164	2,258	5,201	0,378	0,049	0,110
	Parasutterella_excrementihominis_YIT_11859_JCM_15078_DSM_21040_AB370250	Parasutterella	1,475	1,554	0,522	1,101	0,900	0,004	0,041
	Barnesiella_intestinibominis_YIT_11860_AB370251	Barnesiella	0,059	0,046	0,017	0,075	0,660	0,051	0,097
	Barnesiella_intestinibominis_YIT_11860_AB370251	Barnesiella	0,047	0,013	0,023	0,077	0,106	0,033	0,235
	Clostridium_sp_Culture_54_AB622823	unclassified_Lachnospiraceae	0,018	0,034	0,007	0,032	0,350	0,028	0,309
	Staphylococcus_jentus_PLC_6_AY161045	Staphylococcus	0,000	0,000	0,091	0,021	na	0,021	0,356
	Clostridium_leptum_DSM_753T_AJ305238	Clostridium_IV	0,018	0,000	0,000	0,009	0,202	0,037	0,202

Table S2, Daillère et al., Immunity

IV. CONCLUSIONS

Il est désormais clairement établi que les infections font partie des principales menaces pour les patients hospitalisés. L'avènement des antibiotiques et des protocoles d'antibiothérapie ont permis d'augmenter de façon significative la survie des malades et permettent d'améliorer les conditions de santé de la population générale. Les bactéries appartenant au genre *Enterococcus* sp. semblent être à l'interface de nombreuses problématiques cliniques. En plus de leur rôle symbiotique au sein des microbiotes et en particulier du microbiote intestinal, ces micro-organismes sont comme précédemment décrit, responsables d'infections acquises en ville mais surtout à l'hôpital. Plus récemment, ce microbiote a été décrit comme pouvant être un déterminant essentiel dans la réponse immunitaire anti-tumorale. L'une des principales problématiques actuelles est liée à l'utilisation non-contrôlée des antibiotiques responsable de l'apparition de dysbioses des microbiotes et d'une augmentation *quasi* continue des taux de résistance. En effet, en raison d'une utilisation massive de ces derniers, les bactéries ont dû s'adapter et développer des mécanismes spécifiques leur permettant de survivre à cette forte pression de sélection. Depuis le milieu des années 1980 et le début des années 1990, la multi-résistance bactérienne est devenue un problème majeur avec l'apparition de souches de SARM et de *S. aureus* de sensibilité réduite aux glycopeptides (GISA-VISA), de souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération puis aux carbapénèmes, ou encore l'émergence de souches d'ERG. Du fait de cette multi-résistance aux antimicrobiens, les alternatives thérapeutiques envisageables pour traiter les patients se sont amenuisées de façon drastique malgré une pharmacopée riche en molécules de diverses classes antibiotiques. Afin de palier à ce problème, de nouvelles classes d'antibiotiques ont vu le jour dès le début des années 1990 et de nombreuses études ont été et continuent d'être menées afin d'étudier au mieux les mécanismes de résistance développés par les bactéries. Cependant, les patients hospitalisés, et en particulier les patients admis dans des services de réanimation reçoivent une pléiade

d'autres molécules *a priori* non-antibiotiques. L'impact de ces molécules thérapeutiques sur la physiologie bactérienne, et en particulier sur *E. faecium*, est actuellement inconnu mais semble être une information intéressante pour comprendre un peu mieux les mécanismes adaptatifs utilisés par la bactérie. Enfin, il semblerait que les bactéries qui composent le microbiote humain jouent un rôle non négligeable dans la modulation du processus inflammatoire. Cette constatation a amené à s'intéresser à l'utilisation de bactéries, et plus particulièrement de *E. hirae*, comme traitement adjuvant dans la thérapeutique anti-tumorale, sous la forme d'oncobiotes. C'est dans ce contexte, que les différents aspects de ce travail de thèse ont été conduits. Comment un genre bactérien connu pour être principalement un pathogène opportuniste, peut voir une de ses espèces utilisées comme probiotique.

Apparition de nouvelles résistances chez *E. faecium*

Quinupristine-dalfopristine

La quinupristine-dalfopristine (Q-D) est une molécule peu connue en France car n'ayant plus d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), son utilisation en clinique est restée marginale. Cependant, plusieurs pays européens ainsi que les Etats-Unis l'utilisent lors d'échecs thérapeutiques dans le traitement des infections à bactéries à Gram positif multi-résistantes, comme les ERV (Dowzicky et al. 2000). La résistance à cette molécule est le plus souvent médiée par l'acquisition horizontale d'un gène de la famille *erm* codant pour une méthylase qui va entraîner une modification de la cible ribosomale et de ce fait masquer une des positions d'ancrage de la molécule sur le ribosome (A2058) mais aussi par l'acquisition de différentes enzymes hydrolysant une des deux molécules composant la synergistine, comme *vat(A)*, *vat(B)*, ou *Vgb*. Ici, nous avons pu démontrer que sous pression de sélection d'un antibiotique de la famille des MLSP, des mutants résistants pouvaient apparaître. Cette résistance est due à l'apparition d'une mutation au sein d'un gène codant pour une protéine

ABC de type II. Cette mutation, stable dans le temps, permet à la bactérie de développer un phénotype de résistance particulier dit LS_AP. Ce travail nous a permis de décrire pour la première fois une mutation génique responsable de l'apparition du phénotype LS_AP chez *E. faecium*, alors que ce phénotype avait déjà été rapporté chez *E. faecalis*, *S. agalactiae*, *S. sciuri* et *S. aureus*.

Tigécycline

Tout comme la Q-D, la tigécycline est apparue à la fin des années 1990 afin de palier à l'utilisation de bi ou trithérapies lors de traitements empiriques en particulier, du fait de son très large spectre d'action. En effet, cette molécule de la famille des glycylicyclines présente l'avantage d'être active sur de très nombreuses bactéries à Gram négatif, dont les entérobactéries porteuses d'une β -lactamase à spectre étendu (BLSE), mais aussi contre les bactéries à Gram positif multi-résistantes comme les SARM, les pneumocoques de sensibilité diminuée aux pénicillines (PSDP) mais aussi les ERV.

Jusqu'à maintenant, très peu de cas d'échecs thérapeutiques avaient été rapportés chez les bactéries du genre *Enterococcus* (Fiedler *et al.* 2016; Werner *et al.* 2008). De ce fait, le mécanisme de résistance à cette molécule chez *E. faecium* n'avait pas été décrit. Nous avons dans ce travail pu obtenir différents mutants de sensibilité diminuée tant *in vitro* qu'*in vivo* et grâce à l'apport des nouvelles approches moléculaires comme le NGS, nous avons pu identifier une mutation dans un gène codant pour la protéine S10, composant majeur de la cible de la tigécycline, la SU30S du ribosome. Ce travail a permis de décrire pour la première fois une mutation responsable de l'apparition d'un phénotype de résistance à la tigécycline, même si d'autres travaux ont depuis décrit d'autres déterminants dans la résistance aux glycylicyclines comme la surexpression de pompes d'efflux codées par les gènes *tet(L)* et *tet(M)* chez *E. faecium* (Fiedler *et al.* 2016). La diminution de sensibilité à la tigécycline liée à

l'apparition d'une mutation au sein du gène codant pour la protéine S10 a également été rapportée chez d'autres espèces bactériennes (Gram positives et Gram négatives) mettant en évidence un nouveau mécanisme général de résistance au glycylyclines (Beabout *et al.* 2015).

Impact des xénobiotiques sur la physiologie et le fitness chez *E. faecium*

Les xénobiotiques, qu'ils soient curatifs (antibiotiques, médicaments), toxiques, environnementaux ou de toute autre nature semblent impacter de façon importante la diversité bactérienne des différents microbiotes (Maurice *et al.* 2013). Les patients hospitalisés dans les unités de soins intensifs sont plus que les autres soumis à cette pression ainsi que leurs microbiotes. Nous avons étudié l'impact de différentes molécules médicamenteuses sur la physiologie de *E. faecium*, bactérie pathogène opportuniste et nosocomiale, fortement adaptée à l'environnement hospitalier. Contrairement à de nombreuses études qui démontraient l'impact des catécholamines sur différentes espèces bactériennes (Freestone *et al.* 2012; Lyte *et al.* 2003), nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet sur la croissance ou l'antibiorésistance de ces molécules sur *E. faecium*. Nous avons pu cependant montrer un impact d'une molécule antifongique, la caspofungine, dont la cible eucaryote n'est pas retrouvée chez la bactérie. Cependant, l'effet sur le biofilm de *S. aureus*, de cette molécule en association avec la ciprofloxacine avait déjà fait l'objet d'un travail (Siala *et al.* 2016), mais l'impact de la molécule seule n'avait jusqu'à présent jamais été rapporté chez une bactérie. Nous avons donc démontré par différentes approches tant phénotypiques que transcriptomiques, l'influence que pouvait avoir la caspofungine, xénobiotique *a priori* non-antibiotique sur la physiologie de *E. faecium*.

Les résultats de ce travail semblent avoir une importance dans la prise en charge des patients en réanimation car un certain pourcentage d'entre eux recevra cette molécule qui semble entraîner des modifications importantes sur le fitness de *E. faecium* et en particulier au niveau du métabolisme énergétique de la bactérie. Cependant, la diminution quantitative de certains précurseurs mucopeptidiques du peptidoglycane reste à élucider afin de comprendre comment la caspofungine impacte sur ces derniers et sur la conformation générale de la paroi chez *E. faecium*. L'étude de l'impact de la caspofungine devrait être également étendue à d'autres espèces bactériennes d'intérêt clinique comme *Staphylococcus aureus* ou d'autres espèces à Gram positif retrouvées plus particulièrement au niveau du tractus intestinal humain, dans un futur proche.

E. hirae et son utilisation comme oncobiotique

Le travail que nous avons effectué en collaboration avec l'unité INSERM U1015 du Pr. Zitvogel a permis de mettre en évidence l'importance de *E. hirae* dans la modulation de la réponse immunologique anti-cancéreuse médiée par le CTX en modèle murin. Cette espèce d'entérocoque, peu retrouvée en pathologie humaine, non virulente et peu propice à l'antibio-résistance semble être un candidat intéressant pour une utilisation comme probiotique anticancéreux. La réponse immunologique induite par la translocation de cette bactérie au niveau des organes lymphoïdes secondaires a été ici clairement démontrée, cependant le mécanisme par lequel cette immunomodulation intervient est encore actuellement inconnu et reste donc à élucider par de nouvelles approches rendues possibles par les avancées technologiques en biologie moléculaire. L'impact du microbiote sur l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses commence à être documenté dans la littérature scientifique mais de nombreux travaux restent en cours ou à venir concernant la transposition de ces

résultats en modèle murin vers des traitements chez l'homme. Dans le travail présenté ici, il a été démontré, que les patients présentant un cancer en échec thérapeutique post traitement par sel de platine et qui recevaient un protocole de « vaccination immunologique » à base d'INF- γ obtenu à partir de cellules mononuclées périphériques stimulés par des antigènes de *E. hirae* présentaient une bonne réponse au traitement par CTX avec un taux de survie sans progression intéressant comparativement à d'autres espèces bactériennes. En conclusion, nous pouvons penser que l'utilisation du microbiote intestinal deviendra à terme une option thérapeutique non négligeable comme c'est déjà le cas chez les patients souffrants d'infections répétées à *Clostridium difficile* (van Nood *et al.* 2013).

V. PERSPECTIVES

1. Résistance et phénotype LS_AP

La mutation responsable de l'apparition du phénotype de résistance de type LS_AP chez *E. faecium* se situe dans un gène codant pour une protéine ABC de type II. Cette donnée vient confirmer le rôle des protéines ABC de type II appartenant au sous-groupe dit des ARE dans l'antibio-résistance et plus particulièrement dans la résistance aux MLSP. Cependant, le mécanisme biochimique et physiologique expliquant cette résistance reste non élucidé malgré quelques hypothèses formulées dans la littérature comme l'utilisation d'une autre protéine membranaire d'export par un mécanisme de *by-pass* ou par un mécanisme de protection ribosomale au niveau de l'ARN23S (Kerr *et al.* 2005).

Afin de répondre à cette question un mutant délété isogénique de la souche mutée a été créé et une étude transcriptomique (par RNA-seq) a été initiée entre la souche sensible aux MLSP HM1070, la souche possédant le variant muté du gène *eat(A)* et son mutant délété. Malheureusement, aucune modification significative des transcriptomes n'a été mise en évidence et donc aucun partenaire n'a pu être identifié par cette approche. Une nouvelle analyse transcriptomique en présence de concentrations sub-inhibitrices de clindamycine pourrait potentiellement nous permettre d'obtenir quelques gènes candidats.

Nous avons également effectué des travaux d'*immuno-gold labelling* afin de déterminer si la protéine d'intérêt Eat(A) était une protéine cytosolique ou membranaire. Pour ce faire nous avons synthétisé des anticorps de lapins dirigés contre une partie du peptide d'intérêt, et nous avons fixé ces derniers par des anti-anticorps marqué par une bille d'or, visualisable par microscopie électronique. Les résultats obtenus nous permettent de conclure que la protéine Eat(A) serait une protéine plutôt membranaire.

Les protéines ABC de type II ne possèdent pas de domaine transmembranaire et ne peuvent pas de ce fait être considérées comme des protéines de transport. Cependant, bon

nombre d'entre-elles participent à l'apparition d'une résistance aux antibiotiques de la famille des MLSP qui ont pour cible le ribosome bactérien. Cette constatation nous oriente donc vers une interaction potentielle entre ces ABC protéines et des protéines ribosomales. Afin de confirmer cette hypothèse, des travaux portant sur le ribosome devront être menés avec les différentes souches de l'étude mais aussi le mutant KO isogénique construit. Enfin une approche biochimique est en cours afin d'étudier l'hypothèse de la protection ribosomale grâce à une collaboration avec l'équipe du Pr. Reynald Gillet (IGDR, Rennes).

2. Résistance à la tigécycline

La résistance à la tigécycline semble être en partie médiée par la mutation du gène *rpsJ* puisque dans notre étude, 4 souches sur les 5 ayant une sensibilité diminuée à cette molécule possédaient une mutation au sein de ce gène codant pour la protéine ribosomale S10, composant de la SU 30S du ribosome. Il est clairement établi que la protéine S10 possède une activité de « moonlight protein » et interagit avec la protéine NusB ayant un rôle dans la transcription. Nous avons essayé de construire un mutant délété du gène *rpsJ* afin de confirmer nos résultats obtenus mais malheureusement sans succès, du fait du caractère vraisemblablement essentiel de cette protéine chez *E. faecium*. Nous avons toutefois construit un mutant du gène codant pour la protéine *nusB* afin de voir si cette protéine jouait un rôle dans l'expression phénotypique de la résistance à la tigécycline. Malheureusement, aucune modification du phénotype n'a été observée.

3. Impact des xénobiotiques non antibiotiques sur *E. faecium*

Ce travail représente la première étude de l'impact de molécules non-antibiotiques largement utilisées en médecine humaine sur la physiologie de *E. faecium*. Nos résultats ont montré l'impact important de la caspofungine sur la croissance et la paroi bactérienne, mais aussi sur son niveau de résistance à la vancomycine. De plus, la caspofungine, qui ne possède pas de cible clairement établie chez la bactérie, semble avoir une activité bactériostatique à faibles doses et bactéricide à fortes doses. Les données transcriptomiques obtenues ne nous ont pas permis d'identifier un gène candidat correspondant à une cible de cet antifongique chez *E. faecium*, mais un nombre important de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique de la bactérie sont impactés en présence de caspofungine. Des mutants délétés isogéniques de gènes impliqués dans le métabolisme ou l'utilisation et le transport des carbonhydrates, comme les gènes composant l'opéron *pdhABCD* ou encore les gènes formant l'opéron *glpKOF*, devront être réalisés. De plus, nos résultats ont montré que la caspofungine influait sur l'architecture du peptidoglycane et sur sa composition en mucopeptides. Là encore, des travaux devront être menés afin de comprendre le mécanisme responsable de la diminution significative de certains mucopeptides et précurseurs du peptidoglycane. Enfin, ces résultats nous encouragent à chercher d'autres xénobiotiques responsables d'effets sur *E. faecium* mais également de réfléchir à l'impact de ces mêmes molécules sur une population plus large comme le microbiote intestinal grâce à l'utilisation d'outils comme la métagénomique ou la métatranscriptomique.

4. Utilisation de *E. hirae* comme oncobiotique

L'effet de *E. hirae* sur l'immunomodulation anti-tumorale médiée par le CTX a clairement été établi dans ce travail. Cependant, de nombreux aspects restent à établir. Dans un premier temps, les résultats du transcriptome de *E. hirae* en présence de mafosfamide

devront être exploités afin de conclure quant à l'impact direct que cette molécule non antibiotique pourrait avoir sur la physiologie bactérienne. Les premiers résultats obtenus montrent qu'environ 6% du génome de la souche *E. hirae* 13144 (souche immunogène murine) est impacté lorsque du CTX (25 mg/L) est ajouté au milieu de culture. Les travaux de génomique comparative entre les 5 souches de *E. hirae* devront également être poursuivis afin que cette analyse nous permette de distinguer les raisons qui expliqueraient l'immunogénicité de certaines souches en comparaison à d'autres. Les premiers résultats obtenus montrent ici que la souche immunogène *E. hirae* 13144 possède 78 gènes qui codent pour des protéines qui lui sont propres. Parmi ces dernières, on peut noter la présence de nombreuses protéines phagiques, de divers systèmes toxine-antitoxine et d'une uréase. De plus, grâce à cette étude comparative, nous avons pu mettre en évidence que la souche 13144 était phylogénétiquement proche d'une autre souche utilisée dans notre étude, elle-même isolée des fèces de souris, la souche 13889 (Figure 29).

La suite de ce travail se fera en étroite collaboration avec l'équipe du Pr. Zitvogel.



Figure 29. Représentation phylogénétique des 5 souches étudiées en fonction de la présence/absence de protéines non conservées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abbas M, Paul M, Huttner A. 2017. New and improved? A review of novel antibiotics for Gram-positive bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*. doi:10.1016/j.cmi.2017.06.010.

Allignet J, Aubert S, Morvan A, el Solh N. 1996. Distribution of genes encoding resistance to streptogramin A and related compounds among *Staphylococci* resistant to these antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 2523–28.

Allignet J, Loncle V, el Solh N. 1992. Sequence of a staphylococcal plasmid gene, *vga*, encoding a putative ATP-binding protein involved in resistance to virginiamycin A-like antibiotics. *Gene* **117**; 45–51.

Anderson M.T., Armstrong S.K. 2008. Norepinephrine mediates acquisition of transferrin iron in *Bordetella bronchiseptica*. *Journal of Bacteriology* **190**, 3940–47.

Appelbaum P.C., Hunter P.A. 2000. The Fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents* **16**, 5–15.

Arbeloa A, Segal H, Hugonnet J.E., Josseaume N, Dubost L, Brouard J.P., Gutmann L, Mengin-Lecreulx D, Arthur M. 2004. Role of class A penicillin-binding proteins in PBP5 mediated β -Lactam resistance in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology* **186**, 1221–28.

Arias C.A., Murray B.E. 2012. The rise of the *Enterococcus*: Beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology* **10**, 266–78.

Arias C.A., Panesso D, McGrath D.M., Qin X, Mojica M.F., Miller C, Diaz L, et al. 2011. Genetic basis for in vivo Daptomycin resistance in *Enterococci*. *The New England Journal of Medicine* **365**, 892–900.

Arsène S, Leclercq R. 2007. Role of a Qnr-like gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**, 3254–58.

Arthur M, Reynolds P. E., Depardieu F, Evers S, Dutka-Malen S, Quintiliani R, Courvalin P. 1996. Mechanisms of glycopeptide resistance in *Enterococci*. *The Journal of Infection* **32**, 11–16.

B

Babinchak T, Ellis Grosse E, Dartois N, Rose G. M., Loh E. 2005. The efficacy and safety of Tigecycline for the treatment of complicated intra abdominal infections: Analysis of pooled clinical trial data. *Clinical Infectious Diseases* **41** (Supplement_5), 354–67.

Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat S. F., van Rhijn B. W. G., Compérat E, Sylvester R.J., et al. 2013. EAU guidelines on non-muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder: Update 2013. *European Urology* **64**, 639-53.

Babrowski T, Holbrook C, Moss J, Gottlieb L, Valuckaite V, Zaborin A, Poroyko V, Donald C. Liu D. C., Zaborina O, Alverdy J. C. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* virulence expression is directly activated by morphine and is capable of causing lethal gut derived sepsis in mice during chronic morphine administration. *Annals of Surgery* **255**, 386–93.

Bansal T, Englert D, Lee J, Hegde M, Wood T. K., Jayaraman A. 2007. Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia Coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infection and Immunity* **75**, 4597–4607.

Batard E, Jacqueline C, Boutoille D, Hamel A, Drugeon H. B., Asseray N, Leclercq R, Caillon J, Potel G, Bugnon D. 2002. Combination of Quinupristin-Dalfopristin and Gentamicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Experimental rabbit endocarditis study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 2174–78.

Bates, J. 1997. Epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococci* in the community and the relevance of farm animals to human infection. *The Journal of Hospital Infection* **37**, 89–101.

Bauer G, Berens C, Projan S. J., Hillen W. 2004. Comparison of Tetracycline and Tigecycline binding to ribosomes mapped by dimethylsulphate and drug-directed Fe²⁺ cleavage of 16S rRNA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **53**: 592–99.

Beabout K, Hammerstrom T. G., Perez A. M., Freitas Magalhães B, Prater A. G., Clements T.P., Arias C. A., Saxer G, Shamooy Y. 2015. The ribosomal S10 protein is a general target for decreased tigecycline susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**: 5561-66.

Beargie R, Lynd P, Tucker E, Duhring J. 1975. Perinatal infection and vaginal flora. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **122**; 31–33.

Beis K. 2015. Structural basis for the mechanism of ABC transporters. *Biochemical Society Transactions* **43**, 889–93.

Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini O. 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PloS One* 6 (1): e16424. doi:10.1371/journal.pone.0016424.

Bender J. K., Fleige C, Klare I, Fiedler S, Mischnik A, Mutters N. T., Dingle K. E., Werner G. Detection of a *cfr*(B) variant in German *Enterococcus faecium* clinical isolates and the impact on linezolid resistance in *Enterococcus* spp. *PloS One* 11: e0167042. doi:10.1371/journal.pone.0167042.

Bentorcha F, De Cespédès, Horaud T. 1991. Tetracycline resistance heterogeneity in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 808–12.

Beukers A. G., Zaheer R, Goji N, Amoako K. K., Chaves A. V., Ward M. P., McAllister T. A. 2017. Comparative genomics of *Enterococcus spp.* isolated from bovine feces. *BMC Microbiology* **17**; 52.

Bonten M. J. M., Hayden M. K., Nathan C, van Voorhis J, Matushek M, Slaughter S, Rice T, Weinstein R. A. 1996. Epidemiology of colonisation of patients and environment with vancomycin-resistant Enterococci. *The Lancet* **348**, 1615–19.

Bonten M. J. M., Willems R, Weinstein R. A. 2001. Vancomycin-resistant Enterococci: why are they here, and where do they come from? *The Lancet Infectious Diseases* **1**, 314–25.

Bourafa N, Loucif L, Boutefnouchet N, Rolain J.M. 2015. *Enterococcus hirae*, an unusual pathogen in humans causing urinary tract infection in a patient with benign prostatic hyperplasia: first case report in Algeria. *New Microbes and New Infections* **8**, 7-9

Bourdon N, Lemire A, Fines-Guyon M, Auzou M, Périchon B, Courvalin P, Cattoir V, Leclercq R. 2011. Comparison of four methods, including semi-automated Rep-PCR, for the typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Journal of Microbiological Methods* **84** 74–80.

Bourgogne A, A. Garsin D. A., Qin X, Singh K. V., Sillanpaa J, Yerrapragada S, Ding Y, et al. 2008. Large scale variation in *Enterococcus faecalis* illustrated by the genome analysis of strain OG1RF. *Genome Biology* **9**, R110.

Boyd D. A., Willey B. M., Fawcett D, Gillani N, Mulvey M.R. 2008. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, *vanL*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**, 2667–72.

Bozdogan B, Berrezouga L, Kuo M-S, David A, Yurek D. A., Farley K. A., Stockman B. J., Leclercq R. 1999. A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 925–29.

Bozdogan B, Leclercq R. 1999. Effects of genes encoding resistance to streptogramins A and B on the activity of quinupristin-dalfopristin against *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 2720–25.

Brenciani A, Morroni G, Vincenzi C, Manso E, Mingoia M, Giovanetti E, Varaldo P. E. 2016. Detection in Italy of two clinical *Enterococcus faecium* isolates carrying both the oxazolidinone and phenicol resistance gene *optrA* and a silent multiresistance gene *cfr*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **71**, 1118–19.

Brisson-Noël A, P. Courvalin. 1986. Nucleotide sequence of gene *linA* encoding resistance to Lincosamides in *Staphylococcus haemolyticus*. *Gene* **43**, 247–53.

Brisson-Noël A, Delrieu P, Samain D, Courvalin P. 1988. Inactivation of Lincosaminide antibiotics in *Staphylococcus*. Identification of Lincosaminide O-nucleotidyltransferases and comparison of the corresponding resistance genes. *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 15880–87.

Bryskier A, Bergogne-Berezin E. 1999. Streptogramins. In *Antibiotiques, Agents Antibactériens et Antifongiques.*, Ellipses. Paris, 595–99. Ellipses. Paris.

Bryskier A., Butzler J, Neu P, Tulkens P. M. 1993. *Macrolides. Chemistry, Pharmacology and Clinical Uses.* Arnette Blackwell. A. Bryskier.

Bush K. 1989. Characterization of Beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**, 259–63.

C

Canani R. B., Cirillo P, Terrin G, Cesarano L, Spagnuolo M. I., De Vincenzo A, Albano F, et al. 2007. Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: randomised clinical trial of five different preparations. *British Medical Journal* **335**, 340.

Canu A, Leclercq R. 2001. Overcoming bacterial resistance by dual target inhibition: the case of streptogramins. *Current Drug Targets Infectious Disorders* **1**, 215–25.

Cattoir V, Giard J.C. 2014. Antibiotic resistance in *Enterococcus faecium* clinical isolates. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* **12**, 239–48.

Cattoir V, Isnard C, Cosquer T, Odhiambo A, Bucquet F, Guérin F, Giard J.C. 2015. Genomic analysis of reduced susceptibility to tigecycline in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59** (1): 239–44. doi:10.1128/AAC.04174-14.

Cattoir V, Leclercq R. 2013. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: Is it time to divorce? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **68** (4): 731–42.

Cattoir V, Merabet L, Legrand P, Soussy C.J., Leclercq R. 2007. Emergence of a *Streptococcus pneumoniae* isolate resistant to streptogramins by mutation in ribosomal protein L22 during pristinamycin therapy of pneumococcal pneumonia. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**, 1010–12.

Cattoir V, Nordmann P. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance in Gram-negative bacterial species: an update. *Current Medicinal Chemistry* **16**, 1028–46.

Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy C.J., Nordmann P. 2008. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerging Infectious Diseases* **14**, 231–37.

Celiberto L. S., Bedani R, Dejeni N. N., Ivo de Medeiros A, Sampaio Zuanon J. A., Spolidorio L. C., Tallarico Adorno M. A., et al. 2017. Effect of a probiotic beverage consumption (*Enterococcus faecium* CRL 183 and *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) in rats with chemically induced colitis. *PLoS ONE* **12** (4). doi:10.1371/journal.pone.0175935.

Chen C, Brown D. R., Xie Y, Green B. T., Lyte M. 2003. Catecholamines modulate *Escherichia coli* O157:H7 adherence to murine cecal mucosa. *Shock* **20**, 183–88.

Chesneau O., Ligeret H, Hosan-Aghaie N, Morvan A, Dassa E. 2005. Molecular analysis of resistance to streptogramin a compounds conferred by the vga proteins of staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 973–80.

Chopra I. 2001. Glycylcyclines: third-generation tetracycline antibiotics. *Current Opinion in Pharmacology* **1**, 464–69.

Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**, 232–60.

Clancy J, J. Petitpas J, Dib-Hajj F, Yuan W, Cronan M, Kamath A. V, Bergeron J, Retsema J. A. 1996. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Molecular Microbiology* **22**, 867–79.

Clarke M. B., Hughes D. T., Zhu C, Boedeker E. C., Sperandio V. 2006. The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103** 10420–25.

Cogan T. A., Thomas A. O., Rees L. E. N., Taylor A. H., Jepson M. A., Williams P. H., Ketley J, Humphrey T. J. 2007. Norepinephrine increases the pathogenic potential of *Campylobacter jejuni*. *Gut* **56**, 1060–65.

Cooper E. V. 1946. Gas-gangrene following injection of adrenaline. *Lancet* **1**, 459–61.

Coque T. M., Willems R. J. L., Fortún J, Top J, Diz S, Loza E, Cantón R, Baquero F. 2005. Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a spanish university hospital: setting the scene for a future increase in vancomycin resistance? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 2693–2700.

Costa Y., Galimand M, Leclercq R, Duval J, Courvalin P. 1993. Characterization of the chromosomal *aac(6')-Ii* gene specific for *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**, 1896–1903.

Coudron P. E., Mayhall C. G., Facklam R. R., Spadora A. C., Lamb V. A., Lybrand M. R., Dalton H. P. 1984. *Streptococcus faecium* outbreak in a neonatal intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology* **20**, 1044–48.

Courvalin P. 2006. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases* **42** Suppl 1, S25-34.

Cudliffe E. 1989. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**, 207–33.

D

Lei D, Wu C. M., Wang M. G., Wang Y, Wang Y, Huang S. Y., Xia L. N., Li B. B., Shen J. Z. 2010. First report of the multidrug resistance gene *cfr* and the phenicol resistance gene *fexA* in a *Bacillus* strain from swine feces. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**, 3953–55.

Daillère R, Vétizou M, Waldschmitt N, Yamazaki T, Isnard C, Poirier-Colame V, Duong C. P. M., et al. 2016. *Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* facilitate cyclophosphamide-induced therapeutic immunomodulatory effects. *Immunity* **45**, 931–43.

Dassa E., Bouige P. 2001. The ABC of ABC_S: A phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Research in Microbiology* **152**, 211–29.

Dave M, Higgins P. D., Middha S, Rioux K. P. 2012. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Translational Research*, **160**, 246–57.

Davidson A. L., Dassa E, Orelle C, Chen J. 2008. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-Binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72**, 317–64.

Deibel R. H., Lake D. E., Niven C. F. 1963. Physiology of the enterococci as related to their taxonomy. *Journal of Bacteriology* **86**, 1275–82.

Demerec M. 1945. Production of staphylococcus strains resistant to various concentrations of penicillin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **31**, 16–24.

Demerrec M. 1949. Patterns of bacterial resistance to penicillin, aureomycin, and streptomycin. *The Journal of Clinical Investigation* **28**, 891–93.

Depardieu F, Courvalin P. 2001. Mutation in 23S rRNA responsible for resistance to 16 membered macrolides and streptogramins in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 319–23.

Depardieu F, Kolbert M, Pruul H, Bell J, Courvalin P. 2004. VanD-type vancomycin resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 3892–3904.

Diaz L, Tran T. T., Munita J. M., Miller W. R, Rincon S, Carvajal L. P., Wollam A, et al. 2014. Whole-genome analyses of *Enterococcus faecium* isolates with diverse daptomycin MICs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**, 4527–34.

Dicpinigaitis P.V., De Aguirre M, Divito J. 2015. *Enterococcus hirae* bacteremia associated with acute pancreatitis and septic shock. *Case Reports in Infectious Diseases* 2015: 123852. doi:10.1155/2015/123852.

Dina J, Malbruny B, Leclercq R. 2003. Non-sense mutations in the lsa-like gene in *Enterococcus faecalis* isolates susceptible to lincosamides and streptogramins A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**, 2307–9.

Dowd S.E. 2007. *Escherichia coli* O157:H7 gene expression in the presence of catecholamine norepinephrine. *FEMS Microbiology Letters* **273**, 214–23.

Dowzicky M. G., Talbot H, Feger C, Prokocimer P, Etienne J, Leclercq R. 2000. Characterization of isolates associated with emerging resistance to quinupristin/dalfopristin (Synercid®) during a worldwide clinical program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **37**, 57–62.

Dreier I, Kumar S, Søndergaard H, Rasmussen M.L., Hansen L. H., Holmgaard List N, Kongsted J, Vester B, Nielsen P. 2012. A click chemistry approach to pleuromutilin derivatives, part 2: Conjugates with acyclic nucleosides and their ribosomal binding and antibacterial activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **55**, 2067–77.

Dugan A.L., Gregerson K. A., Neely A, Gardner J, Noel G. J, Babcock G. F., Horseman N. D. 2010. Mice treated with a benzodiazepine had an improved survival rate following *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Journal of Burn Care & Research* **31**, 1–12.

Dutka-Malen S, Leclercq R, Coutant V, Duval J, Courvalin P. 1990. Phenotypic and genotypic heterogeneity of glycopeptide resistance determinants in gram-positive bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34**, 1875–79.

Dzutsev A, Goldszmid R. S., Viaud S, Zitvogel L, Trinchieri G. 2015. The role of the microbiota in inflammation, carcinogenesis, and cancer therapy. *European Journal of Immunology* **45**, 17–31.

E

Economou V, Gousia P. 2015. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance* **8**, 49–61.

Eliopoulos G. M. 2003. Quinupristin-dalfopristin and linezolid: evidence and opinion. *Clinical Infectious Diseases* **36**, 473–81.

Ellis-Grosse E. J., Babinchak T, Dartois N, Rose G, Loh E, Tigecycline 300 cSSSI Study Group, and Tigecycline 305 cSSSI Study Group. 2005. The efficacy and safety of tigecycline in the treatment of skin and skin-structure infections: Results of 2 double-blind phase 3 comparison studies with vancomycin-aztreonam. *Clinical Infectious Diseases* **41** Suppl 5, S341-353.

Euzéby J. 2008. Notification of changes in taxonomic opinion previously published outside the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 1515.

F

Fan R, Li D, Wang Y, He T, Feßler A. T., Schwarz S, Wu C. 2016. Presence of the *optrA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* of porcine origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **60**, 7200–7205.

Fantin B, Leclercq R, Garry L, Carbon C. 1997. Influence of inducible cross-resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin B-type antibiotics in *Enterococcus faecium* on activity of quinupristin-dalfopristin in vitro and in rabbits with experimental endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 931–35.

Fenselau C, Demirev P. A. 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **20**, 157–71.

Ferrero L, Cameron B, Manse B, Lagneaux D, Crouzet J, Famechon A, Blanche F. 1994. Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: A primary target of fluoroquinolones. *Molecular Microbiology* **13**, 641–53.

Fiedler S, Bender J. K., Klare I, Halbedel S, Grohmann E, Szewzyk U, Werner G. 2016. Tigecycline resistance in clinical isolates of *Enterococcus faecium* is mediated by an upregulation of plasmid-encoded tetracycline determinants *tet(L)* and *tet(M)*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **71**, 871–81.

Flahaut S, Boutibonnes P, Auffray Y. 1997. Enterococci in human environment. *Canadian Journal of Microbiology* **43**, 699–708.

Fluit A. C., Florijn A, Verhoef J, Milatovic D. 2005. Presence of tetracycline resistance determinants and susceptibility to tigecycline and minocycline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 1636–38.

Foulquié Moreno M. R., Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* **106**, 1–24.

Franz C. M. A. P., Holzapfel W. H., Stiles M. E. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology* **47**, 1–24.

Franz C. M. A. P., Stiles M. E., Schleifer K. H., Holzapfel W. H. 2003. Enterococci in foods: a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* **88**, 105–22.

Freestone P. P., Hirst R. A., Sandrini S. M., Sharaff F, Fry H, Hyman S, O’Callaghan C. 2012. *Pseudomonas aeruginosa*-catecholamine inotropic interactions: A contributory factor in the development of ventilator-associated pneumonia? *Chest* **142**, 1200–1210.

Friedman D. I., Schauer A. T., Baumann M. R., Baron L. S., Adhya S. L. 1981. Evidence that ribosomal protein S10 participates in control of transcription termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 1115–18.

G

Gaboriau-Routhiau V, Cerf-Bensussan N. 2016. Microbiote intestinal et développement du système immunitaire. *médecine/sciences* **32**, 961–67.

Galloway-Peña J, Roh J. H., Latorre M, Qin X, Murray B. E. 2012. Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*.” *PLoS ONE* **7** (1). doi:10.1371/journal.pone.0030187.

Gálvez A, Abriouel H, R. L., Ben Omar N. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* **120**, 51–70.

Gellert M, Mizuuchi K, O’Dea M. H., Nash H. A. 1976. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**, 3872–76.

Gentry D.R, McCloskey L, Gwynn M.N., Rittenhouse S.F., Scangarella N, Shawar N, Holmes D.J. 2008. Genetic characterization of Vga ABC proteins conferring reduced susceptibility to pleuromutilins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**, 4507–9.

Georgopapadakou N. H. 2001. Update on antifungals targeted to the cell wall: focus on Beta 1,3-glucan synthase inhibitors. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **10**, 269–80.

Gilmore M. S., Lebreton F, van Schaik W. 2013. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Current Opinion in Microbiology* **16**, 10.

Goossens H. 1998. Spread of vancomycin-resistant enterococci: Differences between the United States and Europe. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **19**, 546–51.

Gordon S, Swenson J. M., Hill B. C., Pigott N. E., Facklam R. R., Cooksey R. C, Thornsberry C, Jarvis W. R., Tenover F. C. 1992. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. Enterococcal Study Group. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 2373–78.

Gravey F, Galopin S, Grall N, Auzou M, Andremont A, Leclercq R, Cattoir V. 2013. Lincosamide resistance mediated by *lnu(C)* (L Phenotype) in a *Streptococcus anginosus* clinical isolate. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **68**, 2464–67.

Grayson M. L., Eliopoulos G. M., Wennersten C. B., Ruoff K. L., De Girolami P. C., Ferraro M. J., Moellering R. C. 1991. Increasing resistance to Beta-lactam antibiotics among clinical isolates of *Enterococcus faecium*: A 22-year review at one institution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 2180–84.

Green B. T., Lyte M, Chen C, Xie Y, Casey M. A., Kulkarni-Narla A, Vulchanova L, Brown D. R. 2004. Adrenergic modulation of *Escherichia coli* O157:H7 adherence to the colonic mucosa. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **287** G1238–46.

Grivennikov S. I., Wang K, Mucida D, Stewart C. A., Schnabl B, Jauch D, Taniguchi K, et al. 2012. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17 mediated tumour growth. *Nature* **491**, 254–58.

Guérin F, Lallement C, Isnard C, Dhalluin A, Cattoir V, Giard J.C. 2016. Landscape of resistance-nodulation-cell division (RND)-type efflux pumps in *Enterobacter cloacae* complex.” *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 2373–82.

Guzman Prieto A. M., van Schaik W, Rogers M. R. C., Coque T. M., Baquero F, Corander J, Willems R. J. L. 2016. Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones? *Frontiers in Microbiology* **7** (May).

H

Harms J, Schlünzen M. F., Fucini P, Bartels H, Yonath A. 2004. Alterations at the peptidyl transferase centre of the ribosome induced by the synergistic action of the streptogramins dalbopristin and quinupristin. *BMC Biology* **2**, 4.

Hayashi H, Takahashi R, Nishi T, Sakamoto M, Benno Y. 2005. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of Medical Microbiology* **54**, 1093–1101.

Hayden M. K. 2000. Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin resistant enterococci. *Clinical Infectious Diseases* **31**, 1058–65.

Henderson D. P., Payne S. M. 1994. *Vibrio cholerae* iron transport systems: Roles of heme and siderophore iron transport in virulence and identification of a gene associated with multiple iron transport systems. *Infection and Immunity* **62**, 5120–25.

Hershberger E, Donabedian S, Konstantinou K, Zervos M. J. 2004. Quinupristin dalbopristin resistance in Gram-positive bacteria: Mechanism of resistance and epidemiology. *Clinical Infectious Diseases* **38**, 92–98.

Holzappel W. H., Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld J. H. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* **41**, 85–101.

Horvath P, Barrangou R. 2010. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* **327**, 167–70.

Hrdlickova R, Toloue M, Tian B. 2017. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **8** (1): n/a-n/a. doi:10.1002/wrna.1364.

Humphries R. M., Pollett S, Sakoulas G. 2013. A current perspective on daptomycin for the clinical microbiologist. *Clinical Microbiology Reviews* **26**, 759–80.

Huycke M. M., Sahn D. F., Gilmore M. S. 1998. Multiple-drug resistant enterococci: The nature of the problem and an agenda for the future. *Emerging Infectious Diseases* **4**, 239–49.

I

Iida N, Dzutsev A, Stewart C. A, Smith L, Bouladoux N, Weingarten R. A., Molina D. A., et al. 2013. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science* **342**, 967–70.

Isnard C, Malbruny B, Leclercq R, Cattoir V. 2013. Genetic basis for in vitro and in vivo resistance to lincosamides, streptogramins A, and pleuromutilins (LSAP Phenotype) in *Enterococcus faecium*.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**, 4463–69.

Ives A. M., Bertke A. S. 2017. Stress hormones epinephrine and corticosterone selectively modulate Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) and HSV-2 productive infections in adult sympathetic, but not sensory, neurons. *Journal of Virology* **91**, (13). doi:10.1128/JVI.00582-17.

Iweriebor B. C., Obi L. C, Okoh A. I. 2016. Macrolide, glycopeptide resistance and virulence genes in *Enterococcus* species isolates from dairy cattle. *Journal of Medical Microbiology* **65**, 641–48.

J

Jeffery C. J. 2003. Moonlighting proteins: Old proteins learning new tricks. *Trends in Genetics* **19**, 415–17.

Jett B. D., Huycke M. M., Gilmore M. S. 1994. Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* **7**, 462–78.

Jolivet S, Fines-Guyon M, Nebbad B, Merle J. C., Le Pluart D, Brun-Buisson C, Decousser J.W., Cattoir V. 2016. First nosocomial outbreak of vanA-type vancomycin resistant *Enterococcus raffinosus* in France. *The Journal of Hospital Infection* **94**, 346–50.

Jones P. M., George A. M. 1999. Subunit interactions in ABC transporters: Towards a functional architecture. *FEMS Microbiology Letters* **179**, 187–202.

Jones R. N., Marshall S. A., Pfaller M. A., Wilke W. W., Hollis R. J., Erwin M. E., Edmond M. B., Wenzel R. P. 1997. Nosocomial enterococcal blood stream infections in the SCOPE program: Antimicrobial resistance, species occurrence, molecular testing results, and laboratory testing accuracy. SCOPE hospital study group. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **29**, 95–102.

Jung D, Powers J. P., Straus S. K., Hancock R. E. W. 2008. Lipid-specific binding of the calcium-dependent antibiotic daptomycin leads to changes in lipid polymorphism of model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* **154**, 120–28.

Jung D, Rozek A, Okon M, Hancock R. E. W. 2004. Structural transitions as determinants of the action of the calcium-dependent antibiotic daptomycin. *Chemistry & Biology* **11**, 949–57.

K

Kakinuma Y. 1998. Inorganic cation transport and energy transduction in *Enterococcus hirae* and other streptococci. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 1021–45.

Karavolos M. H., Spencer H., Bulmer D. M., Thompson A., Winzer K., Williams P., Hinton J. C. D., Anjam Khan C. M. 2008. Adrenaline modulates the global transcriptional profile of *Salmonella* revealing a role in the antimicrobial peptide and oxidative stress resistance responses. *BMC Genomics* **9**, 458.

Karlin K. D. 1993. Metalloenzymes, structural motifs, and inorganic models. *Science* **261** 701–8.

Kawalec M, Gniadkowski M, Zaleska M, Ozorowski T, Konopka L, Hryniewicz W. 2001. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the phenotype VanB in a hospital in Warsaw, Poland: Probable transmission of the resistance determinants into an endemic vancomycin-susceptible strain. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 1781–87.

Kayaoglu G, Ørstavik D. 2004. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **15**, 308–20.

Keeney D, Ruzin A, McAleese F, Murphy E, Bradford P. A. 2008. MarA-mediated overexpression of the AcrAB efflux pump results in decreased susceptibility to tigecycline in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **61**, 46–53.

Kehrenberg C, Ojo K. K., Schwarz S. 2004. Nucleotide sequence and organization of the multiresistance plasmid pSCFS1 from *Staphylococcus sciuri*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**, 936–39.

Kerr I. D., Reynolds E. D., Cove J. H. 2005. ABC proteins and antibiotic drug resistance: is it all about transport? *Biochemical Society Transactions* **33**, 1000–1002.

Kerr I. D., Jones P. M., George A. M. 2010. Multidrug efflux pumps: The structures of prokaryotic ATP-binding cassette transporter efflux pumps and implications for our understanding of eukaryotic P-glycoproteins and homologues. *FEBS Journal* **277**, 550–63.

Klare I, Konstabel C, Badstübner D, Werner G, Witte W. 2003. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International Journal of Food Microbiology* **88** 269–90.

Klein G. 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology* **88**, 123–31.

Korczynska M, Mukhtar T. A., Wright G. D, Berghuis A. M. 2007. Structural basis for streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus* by Virginiamycin B lyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 10388–93.

Kos V, Ford R.C. 2009. The ATP-binding cassette family: A structural perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**, 3111–26.

Kramer A, Schwebke I, Kampf G. 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases* **6**, 130.

L

Lam M. M. C., Seemann T, Bulach D. M., Gladman S. L., Chen H, Haring V, Moore R. J., et al. 2012. Comparative analysis of the first complete *Enterococcus faecium* genome. *Journal of Bacteriology* **194**, 2334–41.

Lancefield R. C. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *The Journal of Experimental Medicine* **57**, 571–95.

Lane D. J., Pace B, Olsen G. J., Stahl D. A., Sogin M. L., Pace N. R. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 6955–59.

Leavis H. L., Willems R. J. L., van Wamel W. J. B., Schuren F. H., Caspers M. P. M., Bonten M. J. M. 2007. Insertion sequence–driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium*. *PLoS Pathogens* **3** (1). doi:10.1371/journal.ppat.0030007.

Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, Leclercq R, Courvalin P, Cattoir V. 2011. D-Ala-D-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**, 4606–12.

Lebreton F, Le Bras F, Reffuveille F, Ladjouzi R, Giard J. C., Leclercq R, Cattoir V. 2011. *Galleria mellonella* as a model for studying *Enterococcus faecium* host persistence. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **21**, 191–96.

Lebreton F, Manson A. L., Saavedra J. T., Straub T. J., Earl A. M., Gilmore M. S. 2017. Tracing the Enterococci from paleozoic origins to the hospital. *Cell* **169**, 849–861.

Lebreton F, van Schaik W, McGuire A. M., Godfrey P, Griggs A, Mazumdar V, Corander J, et al. 2013. Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. *mBio* **4** (4). doi:10.1128/mBio.00534-13.

Lebreton F, van Schaik W, Sanguinetti M, Posteraro B, Torelli R, Le Bras F, Verneuil N, et al. 2012. AsrR Is an oxidative stress sensing regulator modulating *Enterococcus faecium* opportunistic traits, antimicrobial resistance, and pathogenicity. *PLoS Pathogens* **8** (8): e1002834. doi:10.1371/journal.ppat.1002834.

Leclercq R. 1997. Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clinical Infectious Diseases* **24** Suppl 1, S80-84.

Leclercq R. 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases* **34**, 482–92.

Leclercq R, Courvalin P. 2002. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 2727–34.

Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *New England Journal of Medicine* **319**, 157–61.

Leclercq R, Oberlé K, Galopin S, Cattoir V, Budzinski H, Petit F. 2013. Changes in enterococcal populations and related antibiotic resistance along a medical center-wastewater treatment plant-river continuum. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 2428–34.

Lenard J. 1992. Mammalian hormones in microbial cells. *Trends in Biochemical Sciences* **17**, 147–50.

LeRoith D, Shiloach J, Roth J, Lesniak M. A. 1981. Insulin or a closely related molecule is native to *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **256**, 6533–36.

Li L, Xu Z, Zhou Y, Sun L, Liu Z, Chen H, Zhou R. 2012. Global effects of catecholamines on *Actinobacillus pleuropneumoniae* gene expression. *PloS One* **7** (2): e31121. doi:10.1371/journal.pone.0031121.

Li X. Z., Plésiat P, Nikaido H. 2015. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* **28**, 337–418.

Li X.-S., Dong W.-C., Wang X.-M., Hu G.-Z., Wang Y.-B., Cai B.-Y, Wu C.-M., Wang Y, and Du X.-D. 2014. Presence and genetic environment of pleuromutilin–lincosamide streptogramin a resistance gene *Isa(E)* in enterococci of human and swine origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **69**, 1424–26.

Lina G, Quaglia A, Reverdy M.-E., Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 1062–66.

Linton K. J. 2007. Structure and function of ABC transporters. *Physiology* **22**, 122–30.

Lolk L, Pøhlsgaard J, Sofie Jepsen A, Hansen L. H., Nielsen H, Steffansen S. I., Sparving L, Nielsen A. B., Birte Vester B, Nielsen P. 2008. A Click chemistry approach to pleuromutilin conjugates with nucleosides or acyclic nucleoside derivatives and their binding to the bacterial ribosome. *Journal of Medicinal Chemistry* **51**, 4957–67.

Long K. S., Hansen L. H., Jakobsen L, Vester B. 2006. Interaction of pleuromutilin derivatives with the ribosomal peptidyl transferase center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**, 1458–62.

Luo X, Hsiao H.-H., Bubunenko M, Weber G, Court D. L., Gottesman M. E., Urlaub H, Wahl M. C. 2008. Structural and functional analysis of the *E. coli* NusB-S10 transcription antitermination complex. *Molecular Cell* **32**, 791–802.

Lyte M. 2004. Microbial endocrinology and infectious disease in the 21st century. *Trends in Microbiology* **12**, 14–20.

Lyte M, Freestone P. P. E., Neal C. P., Olson B. A., Haigh R. D., Bayston R, Williams P. H. 2003. Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes. *The Lancet* **361**, 130–35.

M

Magill S. S., Edwards J. R., Bamberg W, Beldavs Z. G., Dumyati G, Kainer M. A., Lynfield R, et al. 2014. Multistate point-prevalence survey of health care–associated infections. *The New England Journal of Medicine* **370**, 1198–1208.

Magnani D, Solioz M. 2005. Copper chaperone cycling and degradation in the regulation of the *cop* operon of *Enterococcus hirae*. *Biometals* **18**, 407–12.

Mainardi J.-L., Villet R, Bugg T. D., Mayer C, Arthur M. 2008. Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **32**, 386–408.

Maisnier-Patin S, Roth J. R. 2015. The origin of mutants under selection: How natural selection mimics mutagenesis (adaptive mutation). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **7**, (7): a018176. doi:10.1101/cshperspect.a018176.

Malbruny B, Werno A. M., Murdoch D. R., Leclercq R, Cattoir V. 2011. Cross-resistance to lincosamides, streptogramins A, and pleuromutilins due to the *lsa(C)* gene in *Streptococcus agalactiae* UCN70. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**, 1470–74.

Marraffini L. A., Sontheimer E. J. 2010. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics* **11**, 181–90.

Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby G. A. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**, 797–99.

Maurice C. F., Haiser H. J., Turnbaugh P. J. 2013. Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. *Cell* **152**, 39–50.

Maynard C. L., Elson C. O., Hatton R. D., Weaver C. T. 2012. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* **489**, 231–41.

McAleese F, Petersen P, Ruzin A, Dunman P. M., Murphy E, Projan S. J., Bradford P. A. 2005. A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* mutants to tigecycline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 1865–71.

McCulloch E. C. 1947. The resistance of chronic staphylococcal bovine mastitis to massive penicillin therapy. *American Journal of Veterinary Research* **8**, 173–77.

Miller W. R., Munita J. M., Arias C. A. 2014. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* **12**, 1221–36.

Mishra N. N., Bayer A. S., Tran T. T., Shamoo Y, Mileykovskaya E, Dowhan W, Guan Z, and Arias C. A. 2012. Daptomycin resistance in enterococci is associated with distinct alterations of cell membrane phospholipid content. *PloS One* **7**, (8): e43958.
doi:10.1371/journal.pone.0043958.

Montero C. I., Stock F, Murray P. R. 2008. Mechanisms of resistance to daptomycin in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**, 1167–70.

Mundt J. O., Coggin, J. H., Johnson L. F. 1962. Growth of *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* on plants. *Applied Microbiology* **10**, 552–55.

Munita J. M., Mishra N. N., Alvarez D, Tran T. T., Diaz L, Panesso D, Reyes J, et al. 2014. Failure of high-dose daptomycin for bacteremia caused by daptomycin-susceptible *Enterococcus faecium* harboring LiaSR substitutions. *Clinical Infectious Diseases* **59**, 1277–80.

Muraih J. K., Pearson A, Silverman J, Palmer M. 2011. Oligomerization of daptomycin on membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1808**, 1154–60.

Murdoch D. R., Corey G. R., Hoen B, Miró J. M., Fowler V. G., Bayer A. S., Karchmer A. W., et al. 2009. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: The international collaboration on endocarditis–prospective cohort study. *Archives of Internal Medicine* **169**, 463–73.

Murray B. E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews* **3**, 46–65.

N

Nakajima Y. 1999. Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics. *Journal of Infection and Chemotherapy* **5**, 61–74.

Naresh R, Hampson D. J. 2011. Exposure to norepinephrine enhances *Brachyspira pilosicoli* growth, attraction to mucin and attachment to Caco-2 cells. *Microbiology* **157**, 543–47.

Nauts H. C., Swift W. E., Coley B. L. 1946. The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, M.D., reviewed in the light of modern research. *Cancer Research* **6**, 205–16.

Neely A. N., Maley M. P. 2000. Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastic. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 724–26.

Nikaido H. 1996. Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* **178**, 5853–59.

Nissen P, Hansen J, Ban N, Moore P. B., Steitz T. A. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**, 920–30.

Nood E van, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal E. G., de Vos W. M., Visser C. E., et al. 2013. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *New England Journal of Medicine* **368**, 407–15.

Noskin G. A. 2005. Tigecycline: A new glycycline for treatment of serious infections. *Clinical Infectious Diseases* **41** (Supplement_5), S303–14.

O

Oldham M. L., Davidson A. L., Chen J. 2008. Structural insights into ABC transporter mechanism. *Current Opinion in Structural Biology* **18**, 726–33.

Palmer C, Bik E. M., DiGiulio D. B., Relman D. A., Brown P. O. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology* **5** (7): e177.
doi:10.1371/journal.pbio.0050177.

Palmer K. L., Daniel A, Hardy C, Silverman J, Gilmore M. S. 2011. Genetic basis for daptomycin resistance in enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**, 3345–56.

Palmer K. L., Gilmore M. S. 2010. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-Cas. *mBio* **1** (4). doi:10.1128/mBio.00227-10.

Palmer K. L., Godfrey P, Griggs A, Kos V. N., Zucker J, Desjardins C, Cerqueira G, et al. 2012. Comparative genomics of enterococci: Variation in *Enterococcus faecalis*, clade structure in *E. faecium*, and defining characteristics of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*.” *mBio* **3** (1). doi:10.1128/mBio.00318-11.

Pãosinho A, Azevedo T, Alves J. V., Costa I. A., Carvalho G, Peres S. R., Baptista T, Fernando Borges F, Mansinho K. 2016. Acute pyelonephritis with bacteremia caused by *Enterococcus hirae*: A rare infection in humans. *Case Reports in Infectious Diseases* **2016**: 4698462. doi:10.1155/2016/4698462.

Patterson J. E., Masecar B. L., Zervos M. J. 1988. Characterization and comparison of two penicillinase-producing strains of *Streptococcus (Enterococcus) faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32**, 122–24.

Paukner S, Sader H. S., Ivezic-Schoenfeld Z, Jones R. N. 2013. Antimicrobial activity of the pleuromutilin antibiotic BC-3781 against bacterial pathogens isolated in the SENTRY antimicrobial surveillance program in 2010. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**, 4489–95.

Pavie J, Lefort A, Zarrouk V, Chau F, Garry L, Leclercq R, Fantin B. 2002. Efficacies of quinupristin-dalfopristin combined with vancomycin in vitro and in experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in relation to cross-resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin B- type antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 3061–64.

Pendleton J. N., Gorman S. P., Gilmore B. F. 2013. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert review of anti-infective therapy* **11**, 297–308.

Peng Z, Wang W, Hu Y, Li F. 2016. Complete genome sequence of *Enterococcus hirae* R17, a daptomycin-resistant bacterium isolated from retail pork in China. *Genome Announcements* **4** (3). doi:10.1128/genomeA.00605-16.

Pepper K, Horaud T, Le Bouguéneq C, de Cespédès G. 1987. Location of antibiotic resistance markers in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* with similar antibiotypes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **31**, 1394–1402.

Peterson G, Kumar A, Gart E, Narayanan S. 2011. Catecholamines increase conjugative gene transfer between enteric bacteria. *Microbial Pathogenesis* **51**, 1–8.

Pevsner-Fischer M, Tuganbaev T, Meijer M, Zhang S.-H., Zeng Z.-R. Chen M.-H, Elinav E. 2016. Role of the microbiome in non-gastrointestinal cancers. *World Journal of Clinical Oncology* **7**, 200–213.

Piatigorsky J, O'Brien W. E., Norman B. L., Kalumuck K, Wistow G. J., Borrás T, Nickerson J. M., Wawrousek E. F. 1988. Gene sharing by delta-crystallin and argininosuccinate lyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 3479–83.

Poole K. 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-Negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* **10**, 12–26.

Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martínez J. L., Torres C. 2000. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 967–71.

Pos K. M. 2009. Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1794**, 782–93.

Poyart C, Berche P, Trieu-Cuot P. 1995. Characterization of superoxide dismutase genes from Gram-positive bacteria by polymerase chain reaction using degenerate primers. *FEMS Microbiology Letters* **131**, 41–45.

Projan S. J. 2000. Preclinical pharmacology of GAR-936, a novel glycylicline antibacterial agent. *Pharmacotherapy* **20**, 219S–223S; discussion 224S–228S.

Prystowsky J, Siddiqui F, Chosay J, Shinabarger D. L., Millichap J, Peterson L. R., Noskin G. A. 2001. Resistance to linezolid: Characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 2154–56.

Putman M, van Veen H. W., Konings W. N. 2000. Molecular Properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, 672–93.

Q

Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf K. S., Manichanh C, Nielsen T, et al. 2010. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature* **464** 59–65.

R

Regt M. J. A. de, van Schaik W, van Luit-Asbroek M, Dekker H. A. T., van Duijkeren E, Koning C. J. M., Bonten M. J. M., Willems R. J. L. 2012. Hospital and community ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* are evolutionarily closely linked but have diversified through niche adaptation. *PLoS ONE* **7** (2). doi:10.1371/journal.pone.0030319.

Reyes J, Panesso D, Tran T. T., Mishra N. N., Cruz M. R., Munita J. M., Singh K. V., et al. 2015. A liaR deletion restores susceptibility to daptomycin and antimicrobial peptides in multidrug-resistant *Enterococcus faecalis*. *The Journal of Infectious Diseases* **211**, 1317–25.

Reynolds E, Ross J. I., Cove J. H. 2003. Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: Incomplete transporters? *International Journal of Antimicrobial Agents* **22**, 228–36.

Reynolds P. E. 1989. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **8**, 943–50.

Rice L. B., Carias L. L., Rudin S, Hutton R, Marshall S, Hassan M, Josseaume N, Dubost L, Marie A, Arthur M. 2009. Role of class A penicillin-binding proteins in the expression of β -lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *Journal of Bacteriology* **191**, 3649–56.

Richard V. S., Chandy G. M. 1999. Hospital infection control committee. *The National Medical Journal of India* **12**, 194.

Roberts M. C. 2008. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiology Letters* **282**, 147–59.

Roberts M. C., Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen L. B., Rood J, Seppala H. 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 2823–30.

Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby G. A., Macielag M, Abbanat D, Park C. H., Bush K, Hooper D. C. 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: A new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine* **12**, 83–88.

Rodríguez-Martínez J. M., Velasco C, Briales A, García I, Conejo M. C., Pascual A. 2008. Qnr-like Pentapeptide repeat proteins in Gram-positive bacteria. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **61**, 1240–43.

Ross J. I., Eady E. A., Cove J. H., Baumberg S. 1995. Identification of a chromosomally encoded ABC-transport system with which the staphylococcal erythromycin exporter MsrA may interact. *Gene* **153**, 93–98.

Ross J. I., Eady E. A., Cove J. H., Cunliffe W. J., Baumberg S, Wootton J. C. 1990. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the atp binding transport super-gene family. *Molecular Microbiology* **4**, 1207–14.

Ross J.I., Eady E.A., Cove J.H., Baumberg S. 1996. Minimal functional system required for expression of erythromycin resistance by *msrA* in *Staphylococcus aureus* RN4220. *Gene* **183**, 143–48.

Rubino C. M., Xue B, Bhavnani S. M., Prince W. T., Ivezic-Schoenfeld Z, Wicha W. W., Ambrose P. G. 2015. Population pharmacokinetic analyses for BC-3781 using phase 2 data from patients with acute bacterial skin and skin structure infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**, 282–88.

S

Sánchez-Díaz A. M., Cuartero C, Rodríguez J. D., Lozano S, Alonso J. M., Rodríguez Domínguez M, Tedim A. P., et al. 2016. The rise of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* high-risk clones as a frequent intestinal colonizer in oncohaematological neutropenic patients on levofloxacin prophylaxis: A risk for bacteraemia? *Clinical Microbiology and Infection* **22**, 59.

Santagati M, Iannelli F, Oggioni M. R., Stefani S, Pozzi G. 2000. Characterization of a genetic element carrying the macrolide efflux gene *mef(A)* in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 2585–87.

- Sapico F. L., Canawati H. N., Ginunas V. J., Gilmore D. S., Montgomerie J. Z., Tuddenham W. J, Facklam R. R.** 1989. Enterococci highly resistant to penicillin and ampicillin: An emerging clinical problem? *Journal of Clinical Microbiology* **27**, 2091–95.
- Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala J. A., Charlier P.** 2008. The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* **32**, 234–58.
- Schleifer K. H., Kilpper-Bälz R, Kraus J, Gehring F.** 1984. Relatedness and classification of *Streptococcus mutans* and ‘mutans-like’ streptococci. *Journal of Dental Research* **63**, 1047–50.
- Schloissnig S, Arumugam M, Sunagawa S, Mitreva M, Tap J, Zhu A, Waller A, et al.** 2013. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature* **493** 45–50.
- Schmitz F. J., Sadurski R, Kray A, Boos M, Geisel R, Köhrer K, Verhoef J, Fluit A. C.** 2000. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 european university hospitals. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **45**, 891–94.
- Schnappinger D, Hillen W.** 1996. Tetracyclines: Antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Archives of Microbiology* **165**, 359–69.
- Schwabe R. F., Jobin C.** 2013. The microbiome and cancer. *Nature Reviews Cancer* **13**, 800–812.
- Schwarz S, Cardoso M, Wegener H. C.** 1992. Nucleotide sequence and phylogeny of the *tet(L)* tetracycline resistance determinant encoded by plasmid pSTE1 from *Staphylococcus hyicus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**, 580–88.

Schwarz S, Werckenthin C, Kehrenberg C. 2000. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 2530–33.

Shankar V, Baghdayan A. S., Huycke M. M., Lindahl G, Gilmore M. S. 1999. Infection derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and Immunity* **67**, 193–200.

Sharifi-Rad M, Shadanpour S, van Belkum A, Soltani A, Sharifi-Rad J. 2016. First case of vanA-positive *Enterococcus mundtii* in human urinary tract infection in Iran. *New Microbes and New Infections* **11**, 68–70.

Shinabarger D. L., Marotti K. R., Murray R. W., Lin A. H., Melchior E. P., Swaney S. M., Duniak D. S., Demyan W. F., Buysse J. M. 1997. Mechanism of action of oxazolidinones: Effects of linezolid and eperezolid on translation reactions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 2132–36.

Siala W, Kucharíková S, Braem A, Vleugels J, Tulkens P. M., Mingeot-Leclercq M. P., Van Dijck P, Van Bambeke F. 2016. The antifungal caspofungin increases fluoroquinolone activity against *Staphylococcus aureus* biofilms by inhibiting N-acetylglucosamine transferase. *Nature Communications* **7**, (November). doi:10.1038/ncomms13286.

Silverman J. A., Oliver N, Andrew T, Li T. 2001. Resistance studies with daptomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 1799–1802.

Sinel C, Cosquer T, Auzou M, Goux D, Giard J.-C, Cattoir V. 2016. Sequential steps of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* and reversion to hypersusceptibility through Is-mediated inactivation of the liaFSR operon. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, June. doi:10.1093/jac/dkw229.

Singh K. V., Weinstock G. M., Murray B. E. 2002. An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin dalfopristin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 1845–50.

Sistigu A, Viaud S, Chaput N, Bracci L, Proietti E, Zitvogel L. 2011. Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design. *Seminars in Immunopathology* **33**, 369–83.

Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams J. B., Aquino-Michaels K, Earley Z. M., Benjamin F. W., et al. 2015. Commensal bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* **350**, 1084–89.

Skvara F. C. 2004. World War II: Exhibit pages (The Red Cross Society, blood transfusions, discovery of penicillin, malaria). *Scalpel & Tongs: American Journal of Medical Philately* **48** 60–64.

Smythe M. A., Melendy S, Jahns B, Dmuchowski C. 1993. An exploratory analysis of medication utilization in a medical intensive care unit. *Critical Care Medicine* **21**, 1319–23.

Snyder L, Champness W. 2003. *Molecular Genetics of Bacteria*. Second edition. ASM press.

Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán L. G., Gratadoux J. J., Blugeon S, et al. 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of crohn disease patients.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 16731–36.

Solioz M, Abicht H. K., Mermod M, Mancini S. 2010. Response of Gram-positive bacteria to copper stress. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **15**, 3.

Solioz M, Odermatt A, Krapf R. 1994. Copper pumping ATPases: Common concepts in bacteria and man. *FEBS Letters* **346**, 44–47.

Solioz M, Stoyanov J. V. 2003. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiology Reviews* **27**, 183–95.

Sommer F, Moltzau Anderson J, Bharti R, Raes J, Rosenstiel P. 2017. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nature Reviews Microbiology* advance online publication (June). doi:10.1038/nrmicro.2017.58.

Sperandio V, Torres A. G., Kaper J. B. 2002. *Quorum Sensing Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): A novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by *Quorum Sensing* in *E. coli*. *Molecular Microbiology* **43**, 809–21.

Sum P. E., Sum F. W., Projan S. J. 1998. Recent developments in tetracycline antibiotics. *Current Pharmaceutical Design* **4**, 119–32.

Sun Y, Cai Y, Liu X, Bai N, Liang B, Wang R. 2013. The emergence of clinical resistance to tigecycline. *International Journal of Antimicrobial Agents* **41**, 110–16.

Suppola J. P., Kolho E, Salmenlinna S, Tarkka E, Vuopio-Varkila J, Vaara M. 1999. *vanA* and *vanB* incorporate into an endemic ampicillin-resistant vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* strain: Effect on interpretation of clonality. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 3934–39.

T

Tait-Kamradt A, Clancy J, Cronan M, Dib-Hajj F, Wondrack L, Yuan W, Sutcliffe J. 1997. *mefE* is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 2251–55.

Tait-Kamradt A, Davies T, Appelbaum P. C., Depardieu F, Courvalin P, Petitpas J, Wondrack L, Walker A, Jacobs M. R., Sutcliffe J. 2000. Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from eastern Europe and North America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 3395–3401.

Tang Y, Dai L, Sahin O, Wu Z, Liu M, Zhang Q. Emergence of a plasmid-borne multidrug resistance gene *cfr*(C) in foodborne pathogen *Campylobacter*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **72**, 1581–88.

Tannock G. W. 2002. Analysis of the intestinal microflora using molecular methods. *European Journal of Clinical Nutrition* **56**, Suppl 4, S44-S49.

Top J, Willems R, van der Velden S, Asbroek M, Bonten M. J. M. 2008. Emergence of *Clonal Complex 17 Enterococcus faecium* in The Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology* **46**, 214–19.

Top J., Willems R, Blok H, de Regt M, Jalink K, Troelstra A, Goorhuis B, Bonten M. J. M. 2007. Ecological replacement of *Enterococcus faecalis* by multiresistant *Clonal Complex 17 Enterococcus faecium*. *Clinical Microbiology and Infection* **13**, 316–19.

Tran J. H., Jacoby G. A. 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 5638–42.

U

Uttley A. H., Collins C. H., Naidoo J, George R. C. 1988. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* **1**, 57–58.

V

Van Tyne D, Gilmore M. S. 2014. Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Annual Review of Microbiology* **68**, 337–56.

Veleba M, Higgins P. G., Gonzalez G, Seifert H, Schneiders T. 2012. Characterization of RarA, a novel AraC family multidrug resistance regulator in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56**, 4450–58.

Vétizou M; Daillère R, Zitvogel L. 2016. The role of intestinal microbiota in the response to anti-tumor therapies. *Medecine Sciences: 32*, 974–82.

Vétizou M, Pitt J. M., Daillère R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C, Rusakiewicz S, et al. 2015. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* **350**, 1079–84.

Viaud S, Saccheri F, Mignot G, Yamazaki T, Daillère R, Hannani D, Enot D. P., et al. 2013. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science* **342**, 971–76.

Vincent J.-L., Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin C. D., Moreno R, et al. 2009. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* **302**, 2323–29.

W

Wang Y, Lv Y, Cai J, Schwarz S, Cui L, Hu Z, Zhang R, et al. 2015. A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **70**, 2182–90.

Weisblum B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**, 577–85.

Wendlandt S, Lozano C, Kadlec K, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C, Schwarz S. 2013. The enterococcal ABC transporter gene *lsa(E)* confers combined resistance to lincosamides, pleuromutilins and streptogramin A antibiotics in methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **68**, 473–75.

Werner G, Gfrörer S, Fleige C, Witte W, Klare I. 2008. Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German intensive care unit patient. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **61**, 1182–83.

Werner G, Klare I, Spencker F.-B., Witte W. 2003. Intra-hospital dissemination of quinupristin/dalfopristin- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a paediatric ward of a German hospital. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**, 113–15.

Wheeler A. L., Hartel P. G., Godfrey D. G., Hill J. L., Segars W. I. 2002. Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for microbial source tracking. *Journal of Environmental Quality* **31**, 1286–93.

Willems R. J. L., Bonten M. J. M. 2007. Glycopeptide-resistant enterococci: Deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Current Opinion in Infectious Diseases* **20**, 384–90.

Willems R. J. L., van Schaik W. 2009. Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. *Future Microbiology* **4**, 1125–35.

Willems R. J. L., Top J, van Santen M, Robinson D. A., Coque T. M., Baquero F, Grundmann H, Bonten M. J. M. 2005. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerging Infectious Diseases* **11**, 821–28.

Williams J. R., Morgan A. G., Rouch D. A., Brown N. L., Lee B. T. 1993. Copper resistant enteric bacteria from United Kingdom and Australian piggeries. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 2531–37.

Wimberly B. T., Brodersen D. E., Clemons W. M., Morgan-Warren R. J., Carter A. P., Vonnrhein C, Hartsch T, Ramakrishnan V. 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**, 327–39.

Woodford N, Morrison D, Cookson B, George R. C. 1993. Comparison of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from different continents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**, 681–84.

Wunderlich P, Braun L, Fumagalli I, D'Apuzzo V, Heim F, Karly M, Lodi R, Politta G, F. Vonbank F, Zeltner L. 1989. Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus* SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. *The Journal of International Medical Research* **17**, 333–38.

X

Xu X, Lin D, Yan G, Ye X, Wu S, Guo Y, Zhu D, et al. 2010. *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**, 4643–47.

Z

Zitvogel L, Daillère R, Roberti M. P., Routy B, Kroemer G. 2017. Anticancer effects of the microbiome and its products. *Nature Reviews Microbiology* **15**, 465–78.

Zitvogel L, Galluzzi L, Viaud S, Vétizou M, Daillère R, Merad M, Kroemer G. 2015. Cancer and the gut microbiota: an unexpected link. *Science Translational Medicine* **7**, 271.

ANNEXES

1. Annexe 1. Communication affichée aux JRC 2013

Genetic basis for in vitro and in vivo resistance to lincosamides and streptogramins A (LS_A phenotype) in *Enterococcus faecium*

Christophe Isnard¹, Brigitte Malbruny¹, Roland Leclercq^{1,2} and Vincent Cattoir^{1,2}

¹Service de Microbiologie, CHU Côte de Nacre, Caen, France

²EA4655 U2RM, UFR Medecine, Université Caen Basse-Normandie, Caen, France

ABSTRACT

Objectives: As opposed to *Enterococcus faecalis*, which is intrinsically resistant to lincosamides and streptogramins A (LS_A phenotype) by production of an ABC protein named Lsa(A), *Enterococcus faecium* is naturally susceptible. The LS_A phenotype may be selected by lincosamides or streptogramins in *E. faecium* both in vitro and in vivo. The aim of the study was to investigate the molecular mechanism of resistance in strains of *E. faecium* with acquired LS_A phenotype.

Methods: Six LS_A-resistant mutants of *E. faecium* HM1070 selected in vitro by using lincosamycin (LIN), clindamycin (CLI) and dalfoxistin (DAL) were studied. Three different pairs of clinical isolates (pre- and post-exposure to quinupristin-DAL) were also included. Full genome sequence of one lincosamycin-selected mutant (*E. faecium* HM1070/LS_A, e.g. TC5) was determined using the 454 sequencing technology (ROCHE® GATC Biotech, Konstanz, Germany) and was compared with that of wild-type *E. faecium* HM1070. The detection of a single mutation putatively responsible for the LS_A phenotype was performed by PCR for all strains. Single-nucleotide allelic replacement was carried out to confirm the role of this mutation. DNA fragments comprising resistance and susceptibility mutations were cloned into the thermosensitive vector pG1KT and introduced into *E. faecium* HM1070 and TC5 strains, respectively. MICs were determined by using the microbroth dilution method. Putative gene named *lsaEfm* was also cloned into a shuttle vector named pAT29 for over expression studies. Unfortunately the gene transfer for sub-cloning in *E. coli* seemed to be unfeasible. Mutation research was also done in 58 glycopeptides resistant *E. faecium* by DNA amplification performed by PCR then sequencing by 454 sequencing technology (ROCHE® GATC Biotech, Konstanz, Germany).

Results: By comparison of the two entire genomes, 50 point mutations were identified, including one within a 1503-bp gene named *lsaEfm* coding for an ABC homologue showing 66% amino acid identity with Lsa(A). This mutation corresponded to a transition (C1349T) leading to an amino-acid substitution (Thr450Ile) within the Walker B motif of the second nucleotide-binding domain. Strictly identical mutations were identified for in vitro and in vivo resistant strains, but none for susceptible strains. The introduction of the allele from *E. faecium* TC5 into *E. faecium* HM1070 conferred the LS_A phenotype with an increase of MICs of LIN (0.25 to 8 mg/L), CLI (0.12 to 2 mg/L) and DAL (4 to >64 mg/L) whereas that of the allele from *E. faecium* HM1070 into *E. faecium* TC5 restored susceptibility to LIN (8 to 0.25 mg/L), CLI (2 to 0.06 mg/L) and DAL (>64 to 4 mg/L). No results have been found for overexpression studies. Indeed, cell toxicity of *lsaEfm* gene was suspected when it was subcloned into *E. coli*. DNA sequencing for mutation research in 58 GRE strains of our collection (Centre National de Référence associé, résistance aux Antibiologiques) have shown 14/58 strains harbouring the C→T transition in position 1349. All these strains have shown increase MICs to CLI (0.12 to >64 mg/L) and DAL (4 to >64 mg/L).

Conclusion: We identified the molecular mechanism responsible for the acquired LS_A resistance in *E. faecium*. Characterization of the biochemical mechanism of resistance and the physiological role of this ABC protein, thus other LS_A phenotype strains (e.g. *E. gallinarum* or *E. casseliflavus*) genome sequencing, will need further investigations.

OBJECTIVES

- Enterococcus faecium* is one of the most important cause of nosocomial infections in occidental countries [1] [6] and antibiotics treatments issues strongly increase for several years [3] with Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) especially
- Enterococcus faecalis* is intrinsically resistant to lincosamides and streptogramins A, two macrolides related compounds, by production of an ABC homologue protein called Lsa(A) [2].
- E. faecium* remains sensitive to these antibiotics but LS_A phenotype may be selected both in-vitro or in-vivo by lincosamides or streptogramins [4].
- Mutation rates in *lsaEfm* gene remained unknown on vancomycin-resistant *E. faecium* and this data may be interesting for treatment of these multiresistant strains

The aim of the study was to identify the molecular mechanism of LS_A phenotype in *Enterococcus faecium* mutants selected both in-vitro and in-vivo after lincosamides or streptogramins treatment.

METHODS

Bacterial strains and antimicrobial susceptibility testing Six LS_A-resistant mutants selected in vitro with lincosamycin (n=2), clindamycin (n=2), and dalfoxistin (n=2) were studied as well as three different pairs of clinical isolates (pre- and post-exposure to Q-D) [1]. MICs of macrolides, lincosamides, streptogramins, and pleuromutins were determined by the broth microdilution method according to the CLSI guidelines.

Whole-genome sequencing and specific PCR. High-throughput sequencing was performed by using the 454 Life Sciences (Roche) GS-FLX system (DNAVision, Charleroi, Belgium) for *E. faecium* HM1070 wild-type (wt) and TC5 (selected in vitro with lincosamycin). The candidate point mutation was confirmed by PCR for all the strains. Point mutation was also searched on 58 clinical isolates of Vancomycin Resistant *Enterococcus faecium* (VREF) from our collection.

Single-nucleotide allelic replacement. DNA fragments containing resistance and susceptibility mutations were cloned into the thermosensitive vector pG1KT and introduced into *E. faecium* HM1070 and TC5, respectively.

Over-expression study. DNA fragment containing whole *lsaEfm* gene (from HM1070 and TC5 respectively) and kanamycin gene promoter upstream was subcloned into pCR2.1TOP0 (INVITROGEN™) plasmid, digested by Sall restriction enzyme and ligate in a shuttle vector pAT29 [5] then introduced into *E. coli* TOP10 (INVITROGEN™)

RESULTS

1. Identification of a single mutation in a *lsa(A)*-like gene called *lsaEfm*

-By comparing the two genomes, we found 50 different mutations, including one within a 1,503-bp gene coding for an ABC protein homologue to Lsa(A) (66% amino acid identity), named LS_A*Efm*. This mutation was responsible for a transition (C1349T) leading to an amino acid substitution (Thr450Ile) (Figure 1).

-This mutation was located into the Walker B motif of the second nucleotide-binding domain (Figure 1), domain known to be involved in ATP binding.

-By PCR, we confirmed that all susceptible strains and all resistant mutants harboured a threonine and an isoleucine at the position 450, respectively.

2. Mutation prevalence in 58 vancomycin-resistant *E. faecium*:
- DNA fragments harboring the hypothetical mutation was amplified by PCR then compared to *lsaEfm* sequence from *E. faecium* HM1070 (WT). 14/58 strains harboured the point mutation leading to amino acid substitution in position 450. (Figure 2)



Figure 1. Amino acid sequence comparison of LsaEfm from *E. faecium* HM1070 and *E. faecium* TC5.

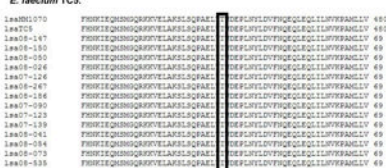


Figure 2. Amino acid sequence comparison between *E. faecium* HM1070 and 14 VREF harboring the mutation responsible for LS_A resistance

RESULTS II

3. Drug susceptibility patterns conferred by single mutations in LS_A*Efm*

-By single-nucleotide allelic replacement, we demonstrated that the mutation Thr450Ile was responsible to the LS_A phenotype (Table 1).

4. LS_A*Efm* mutation prevalence in 58 VREF clinical strains.

-By *lsaEfm* gene sequencing in VREF clinical strains we showed that 14/58 (24,1%) vancomycin-resistant *E. faecium* harbored the T450I substitution responsible for the LS_A phenotype. This data reveals a potential major issue in VREF therapeutic where β-lactams and glycopeptides are unusable antibiotics.

Table 1. MICs of macrolides and related compounds of *E. faecium* strains according to mutations in LS_A*Efm*.

Antibiotic	MIC (mg/L)			
	1	2	3	4
Macrolides				
Erythromycin	0.12	0.12	0.12	0.12
Lincosamides				
Lincosamycin	0.25	8	8	0.25
Clindamycin	0.12	2	2	0.06
Streptogramins				
Dalfoxistin	4	>64	>64	4
Quinupristin	2	2	2	2
Q-D	0.5	2	2	0.5
Pleuromutins				
Tiamulin	0.5	32	64	0.5

1. *E. faecium* HM1070 wt; 2. *E. faecium* TC5; 3. *E. faecium* HM1070 with LS_A*Efm* (Ile-450) from TC5; 4. *E. faecium* TC5 with LS_A*Efm* (Thr-450) from HM1070 wt;

CONCLUSION

✦ This is the first characterization of the molecular mechanism of the acquired LS_A resistance in *E. faecium*

✦ Mutation prevalence in VREF clinical strains has been studied for the first time and furthermore investigations have to be done.

✦ Investigation of the biochemical mechanism of resistance and the physiological role of these ABC proteins will be needed.

REFERENCES

- Arías CA, Murray BE. 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature reviews*.
- Singh KV, Weinstein GM and Murray BE. 2002. An *Enterococcus faecalis* ABC Homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfoxistin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1845-50
- Willems RJ, Bonten MJ. 2007. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemiology. *Curr Opin Infect Dis.* 20:384-90
- Dowdzicky M, Talbot GH, Feger C, Prokocimier P, Etienne J, Leclercq R. 2000. Characterization of isolates associated with emerging resistance to quinupristin/dalfoxistin (Synercid) during a worldwide clinical program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 37:57-62
- Trieu-Cuot P, Carlier C, Poyart-Salmeron C, Couvrouin P. 1990. A pair of mobilizable shuttle vectors conferring resistance to spectinomycin for molecular cloning in *Escherichia coli* and in gram-positive bacteria. *Nucleic Acids Res.* 18:4296
- Murray BE. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev.* 3:46-65



2. Annexe 2. Communication affichée lors de l'ECCMID 2016 (Amsterdam)

Unexpected antibacterial activity of caspofungin against *Enterococcus faecium*

C. Isnard^{1,2}, F. Joalland², Sara Hernandez⁴, D. Goux⁵, Felipe Cava⁴, and V. Cattoir^{1,2,3}

CHU Caen, Service de Microbiologie, Caen, France¹; EA4655 U2RM « équipe antibio-résistance » Université de Caen Normandie, Caen, France², CNR Résistance aux antibiotiques (laboratoire associé 'Entérocoques'), CHU de Caen, Caen, France³, MIMS - Laboratory for Molecular Infection Medicine Sweden, Department of Molecular Biology, Umeå University, Umeå, Sweden⁴, CMAbio, IBFA SF 4206 ICORE, Université de Caen Normandie, Caen, France⁵.

Background: Patients in intensive care units (ICUs) are commonly colonized or infected by multidrug-resistant bacteria, such as *Enterococcus faecium*. Besides antibiotics, almost all of them routinely receive non-antibacterial medications. Whereas these molecules may have significant effects on bacterial physiology, data in the literature are very limited. The aim of this study was then to investigate the impact of different molecules commonly used in ICU patients on *E. faecium*.

Methods: The *vanB*-positive reference strain *E. faecium* Aus0004 was studied for all experiments. Eight drugs were tested: norepinephrine (catecholamine), morphine (opioid analgesic), paracetamol (minor analgesic), midazolam (benzodiazepine), unfractionated heparin (anticoagulant), omeprazole (proton-pump inhibitor), caspofungin [CAS] (antifungal) and atracurium (curare). The effect of each molecule was individually evaluated in vitro by comparative growth kinetics using standard pharmacological concentrations. The impact of CAS (8 mg/L) was deeply characterized using global transcriptomic analysis by RNA-Seq (HiSeq 2500) in duplicates. Genes with an expression fold-change (Log2) >2 and <-2 were considered as up- and down-regulated, respectively, with a statistical significance if $P < 0.05$. Bacterial cell wall was studied by scanning and transmission electron microscopy (EM) while analysis of peptidoglycan was performed using Ultra-Performance Liquid Chromatography. MICs of CAS was determined on Mueller-Hinton (MH) agar using E-test strips as well as those of different antibiotics on MH agar supplemented or not with CAS (8 mg/L). The in vitro selection of mutants with CAS decreased susceptibility was attempted using the Szybalski method during a 3-month period.

Results: Out of the 8 molecules tested, only CAS had a significant effect on growth kinetics of *E. faecium* Aus0004, corresponding to a bacteriostatic activity with a MIC at 32 mg/L. EM experiments revealed that CAS was responsible for serious morphological abnormalities of the bacterial surface, suggesting a strong effect on bacterial cell wall. These results were confirmed by analysis of the peptidoglycan composition that showed a significant decrease of major muropeptide precursors in the presence of CAS. RNA-seq data analysis showed that the expression of 116 genes (ca. 4% of the genome) was significantly altered in the presence of CAS (61 up- and 55 down-regulated), including genes involved in general metabolism (particularly carbohydrate or pyruvate pathways), oxidative stress response (*sodA*) or cytosolic peptidoglycan formation (*murA2*). Interestingly, there was a significant increase (4-to-6 fold) of MICs of vancomycin (but not that of teicoplanin), daptomycin,

levofloxacin and ciprofloxacin whereas the expression of *vanB* was unchanged. No resistant mutants have been obtained in vitro, and it was not possible to identify the bacterial molecular target.

Conclusions: Caspofungin is one of the most important antifungal drug used in ICU patients. This unexpected antibacterial effect emphasizes the potential impact of these drugs (even at sub-inhibitory concentrations) on *E. faecium* opportunistic traits, especially its antimicrobial resistance.

Keywords: Caspofungin, Echinocandins, *E. faecium*

Introduction

Enterococcus faecium is part of the microbiota of the human gastrointestinal tract. Since the last decades, there is an major spread of vancomycin-resistant *E. faecium* (VRE) clinical isolates belonging to the clonal complex CC17, which is well adapted to the hospital environment. Hospitalized patients, especially in ICUs, usually received numerous types of medications. Besides antibiotics, almost all of them routinely receive non-antibacterial medications. Whereas these molecules may have significant effects on bacterial physiology, data are very limited.

The aim of this study was then to investigate and decipher the impact of different molecules commonly used in ICU patients on *E. faecium*.

Materials and methods

Bacterial strain, non-antibiotic molecules and antimicrobial susceptibility testing

The vanB-positive reference strain *E. faecium* AUS0004 was used for all experiments. We tested the eight most prescribed molecules in ICUs: norepinephrine (catecholamine), morphine (opioid analgesic), paracetamol (minor analgesic), midazolam (benzodiazepine), unfractionated heparin (anticoagulant), oneprazole (proton-pump inhibitor), caspofungin [CAS] (antifungal) and atracurium (curare). MICs of vancomycin, teicoplanin, levofloxacin, ciprofloxacin and daptomycin were determined on Mueller-Hinton agar plate supplemented with CAS at a concentration of 8 mg/L, using the Etest strips method (bioMérieux, France).

Growth kinetic curves

The effect of each molecule on *E. faecium* AUS0004 was individually evaluated *in vitro* by comparative growth kinetics using standard pharmacological concentrations in Trypticase-Soja broth (TSB).

Global transcriptomic analysis by RNA-seq

The impact of CAS (at the concentration of 8 mg/L) was deeply evaluated using global transcriptomic analysis by RNA-Seq (RNA extracted at the late exponential phase [6 hours]) (Illumina HiSeq 2500; ProfIXpert, Lyon, France) in duplicates. Bioinformatic and biostatic analysis were performed using CLC software (Qiagen, USA) and DESeq package in R program.

Bacterial cell wall analysis by scanning electron microscopy (SEM)

E. faecium AUS0004 was cultured in TSB supplemented with CAS (8 mg/L) until late-exponential phase (6 hours). The cells were sputtered with platinum and observed with scanning electron microscope JEOL 6400F (Seal Laboratories, USA).

Peptidoglycan analysis by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS)
E. faecium AUS0004 was cultured in TSB supplemented with CAS (8 mg/L) until late-exponential phase (6 hours), early-stationary phase (7.5 hours) and late-stationary phase (10 hours). UPLC-MS/MS analyses of mucopeptides were performed using an ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm x 150 mm (Water, USA) and detected at abs. 204 nm.

Results

Impact of molecules on *E. faecium* growth and antimicrobial susceptibility

Out of the 8 molecules tested, only CAS had a significant effect on growth kinetics of *E. faecium* AUS0004 (Figure 1). Interestingly, we observed that presence of CAS in MH agar plates (8 mg/L), significantly increased MICs of vancomycin, levofloxacin, ciprofloxacin and daptomycin (4-to-6 fold).

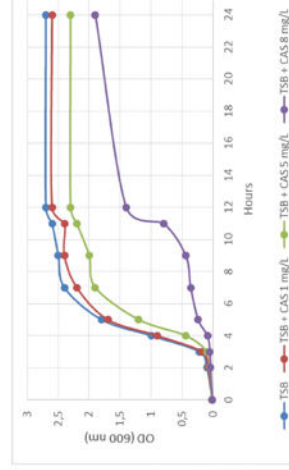
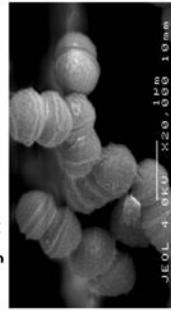


Figure 1. Growth curves of *E. faecium* AUS0004 in TSB with or without CAS.

Impact of CAS on bacterial cell wall and peptidoglycan composition
 SEM experiments revealed that CAS was responsible for serious morphological abnormalities of the bacterial surface, suggesting a strong effect on bacterial cell wall (Figure 2).



TSB + CAS (8 mg/L)

Figure 2. SEM images of *E. faecium* Aus0004 with or without CAS.

Peptidoglycan analysis confirmed that CAS have an important impact on peptidoglycan composition with a significant decrease of major mucopeptide precursors (Figure 3).

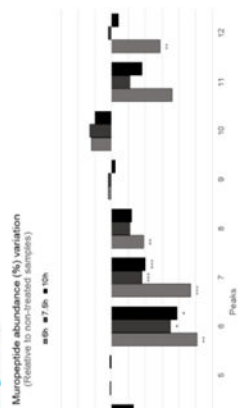


Figure 3. Mucopeptide abundance revealed by UPLC-MS-MS analysis of *E. faecium* Aus0004 peptidoglycan.

Impact of CAS on *E. faecium* transcriptome

RNA-seq data analysis showed that the expression of 116 genes (ca. 4% of the genome) was significantly altered in the presence of CAS (61 up- and 55 down-regulated), including genes involved in general metabolism (particularly carbohydrate or pyruvate pathways), oxidative stress response (*sodA*) or cytosolic peptidoglycan formation (*murA2*).

Conclusions

CAS is one of the most important antifungal drug used in ICU patients. This unexpected antibacterial effect emphasizes the potential impact of these drugs (even at sub-inhibitory concentrations) on *E. faecium* opportunistic traits, especially its antimicrobial resistance.

RESUME / ABSTRACT

***Enterococcus* spp. : entre pathogènes opportunistes et probiotiques**

Les entérocoques, sont des bactéries commensales du tube digestif de l'homme et des animaux, mais certaines espèces, comme *Enterococcus faecium*, sont aussi des pathogènes opportunistes majeurs souvent multi-résistants aux antibiotiques. Nous avons étudié l'impact de molécules non antibiotiques utilisées dans les unités de soins intensifs, sur la virulence et la résistance d'une souche clinique de *E. faecium* par une approche microscopique, une analyse du peptidoglycane et une analyse transcriptomique. Ce travail nous a permis de décrire l'effet antibactérien de la caspofungine, molécule antifongique. Nous avons également étudié deux nouveaux mécanismes de résistance chez *E. faecium* i) la résistance aux lincosamides, streptogramines A et pleuromutilines (phénotype LS_AP) par la mutation ponctuelle d'un gène codant pour une protéine ABC de type II. ii) la diminution de sensibilité à la tigécycline due à l'apparition de mutations au sein du gène *rpsJ* codant pour la protéine ribosomale S10 jouant un rôle dans la formation de la sous-unité 30S du ribosome. Enfin, nous avons participé à une étude sur *Enterococcus hirae*, espèce qui induit la production de sous-populations de lymphocytes T permettant d'augmenter l'efficacité *in vivo* du cyclophosphamide (CTX) dans le traitement de tumeurs chez la souris. Une caractérisation des facteurs de virulence, de la résistance aux antibiotiques et du pouvoir de colonisation d'une collection de souches d'*E. hirae* a été menée, de même qu'une étude transcriptomique en présence de CTX et une étude de génomique comparative, afin de caractériser cette espèce dans l'optique de son utilisation comme oncobiotique.

Mots clés. *E. faecium* ; résistance aux antibiotiques ; caspofungine ; *E. hirae* ; réponse immunitaire ; cyclophosphamide ; oncobiotique

***Enterococcus* spp. : from opportunistic pathogens to probiotics**

Enterococci are commensal bacteria of the human and animal gastrointestinal tract, but some species as *Enterococcus faecium*, are also major opportunistic pathogens often multiply resistant to antibiotics. We studied the impact of non-antibiotic molecules widely used in intensive care units on fitness, virulence and resistance of a clinical isolate of *E. faecium* belonging to CC17 by a microscopic approach, a peptidoglycan analysis and a transcriptomic analysis. This work allowed us to demonstrate the antimicrobial effect of caspofungin, molecule known for its antifungal activity. We also characterized two novel resistance mechanisms found in *E. faecium*: i) resistance to lincosamides, streptogramins A and pleuromutilins (LS_AP phenotype) linked to a point mutation in a gene encoding for a type-II ABC protein. ii) decreased susceptibility to tigecycline due to the occurrence of mutations within the *rpsJ* gene encoding the S10 ribosomal protein that plays a role in 30S ribosomal subunit formation. Finally, we participated to a study concerning *Enterococcus hirae*, species that induces the production of sub-populations of T lymphocytes that increase the *in vivo* efficacy of cyclophosphamide (CTX) in the treatment of murine tumors. A characterization of the virulence factors, antibiotic resistance profiles and colonization capacities of a collection of *E. hirae* isolates was carried out. A transcriptomic study in the presence of CTX and a comparative genomic study were also done, in order to characterize this species in view of its use as an oncobiotic.

Keywords. *E. faecium*; antibiotic resistance; caspofungin; *E. hirae*; immune response; cyclophosphamide; oncobiotic