



Les β -lactamines stimulent une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène chez *Enterococcus faecalis* : un facteur de risque pour le cancer colorectal

Loic Leger

► To cite this version:

Loic Leger. Les β -lactamines stimulent une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène chez *Enterococcus faecalis* : un facteur de risque pour le cancer colorectal. Bactériologie. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMC403 . tel-02918142

HAL Id: tel-02918142

<https://theses.hal.science/tel-02918142>

Submitted on 20 Aug 2020

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

Les β -lactamines stimulent une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène chez *Enterococcus faecalis* : un facteur de risque pour le cancer colorectal

**Présentée et soutenue par
Loïc LEGER**

**Thèse soutenue publiquement le mardi 3 avril 2018
devant le jury composé de**

Mme Mathilde BONNET	Maître de Conférences HDR, Université de Clermont Auvergne	Rapporteur
M Benjamin EZRATY	Chargé de recherche HDR, CNRS, Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
Mme Isabelle MARTIN-VERSTRAETE	Professeur des universités, Université de Paris VII	Examineur
M Axel HARTKE	Professeur des universités, Université de Caen Normandie	Examineur
M Abdellah BENACHOUR	Professeur des universités, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse
M Nicolas VERNEUIL	Maître de Conférences, Université de Caen Normandie	Co-encadrant de thèse

**Thèse dirigée par Abdellah BENACHOUR et co-encadrée par Nicolas VERNEUIL
Laboratoire : Unité de Recherche Risques Microbiens (U2RM)**





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

Les β -lactamines stimulent une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène chez *Enterococcus faecalis* : un facteur de risque pour le cancer colorectal

**Présentée et soutenue par
Loïc LEGER**

**Thèse soutenue publiquement le mardi 3 avril 2018
devant le jury composé de**

Mme Mathilde BONNET	Maître de Conférences HDR, Université de Clermont Auvergne	Rapporteur
M Benjamin EZRATY	Chargé de recherche HDR, CNRS, Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
Mme Isabelle MARTIN-VERSTRAETE	Professeur des universités, Université de Paris VII	Examineur
M Axel HARTKE	Professeur des universités, Université de Caen Normandie	Examineur
M Abdellah BENACHOUR	Professeur des universités, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse
M Nicolas VERNEUIL	Maître de Conférences, Université de Caen Normandie	Co-encadrant de thèse

**Thèse dirigée par Abdellah BENACHOUR et co-encadrée par Nicolas VERNEUIL
Laboratoire : Unité de Recherche Risques Microbiens (U2RM)**



Ce travail a été réalisé au sein de l'Unité de Recherche Risques Microbiens de l'Université de Caen Normandie, actuellement dirigée par le Professeur Axel Hartke. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour la confiance et le soutien qu'il m'a accordés, mais aussi pour ses encouragements et son enthousiasme qu'il transmet au quotidien.

Je remercie vivement le Docteur Mathilde Bonnet, Maître de Conférences à l'Université de Clermont Auvergne, ainsi que le Docteur Benjamin Ezraty, Chargé de Recherche – CNRS de l'Université d'Aix-Marseille, de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail. Je souhaite également exprimer toute ma gratitude à Madame Isabelle Martin-Verstraete, Professeur à l'Université de Paris VII, pour avoir examiné cette thèse.

Je suis particulièrement reconnaissant envers James A Imlay et Benjamin Ezraty pour avoir accepté d'examiner et de discuter notre publication.

Je remercie très sincèrement mon directeur, le Professeur Abdellah Benachour, ainsi que mon co-encadrant de thèse, le Docteur Nicolas Verneuil, pour leur patience, leur soutien, leur disponibilité et leur confiance durant ces quelques années passées ensemble. Nos nombreuses discussions ont rendu ce travail encore plus passionnant.

J'exprime ma plus vive reconnaissance envers le Docteur Aurélie Budin-Verneuil pour avoir, dès le Master, motivé mon ambition de devenir chercheur. Son soutien sans limite, son énergie mais aussi son amitié n'ont fait qu'amplifier mon plaisir à travailler à ses côtés. Je la remercie infiniment et espère avoir de nouveau le privilège d'une collaboration.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe « Stress et Virulence » de l'Unité de Recherche Risques Microbiens, qu'ils sachent que travailler à leurs côtés a été pour moi une expérience enrichissante, tant du point de vue scientifique que sur le plan humain.

Je remercie particulièrement Evelyne Marchand, Isabelle Rincé et Anne-Cécile Appourchaux pour leur gentillesse, leur bonne humeur et leur participation active dans ce travail.

Merci à l'ensemble des étudiants que j'ai eu la chance de rencontrer et qui m'ont aidé dans mon travail. Je remercie tout particulièrement Margherita Cacaci pour son soutien, ses conseils, mais surtout son amitié.

Enfin, cette thèse est aussi l'occasion de remercier mes parents et mes amis qui ont été présents dans les bons comme les moins bons moments.

Table des matières

Abréviations	7
Liste des figures	8
Liste des tableaux	10
 Analyse bibliographique	 11
 Chapitre I. Relation entre le stress oxydatif et l'action des antibiotiques	 12
I.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)	14
I.2. Premières mises en évidence de l'induction d'un stress oxydatif comme composante du mode d'action des antibiotiques	15
I.3. Modèle d'un mécanisme contribuant à la mort cellulaire induite par les antibiotiques bactéricides	16
I.4. Un modèle controversé	20
 Chapitre II. Le genre <i>Enterococcus</i>	 21
II.1. Caractères généraux du genre <i>Enterococcus</i>	21
II.1.1. Historique	21
II.1.2. Phylogénie du genre <i>Enterococcus</i>	22
II.1.3. Caractéristiques morphologiques et physiologiques du genre <i>Enterococcus</i>	22
II.1.4. Habitats des entérocoques	24
II.2. Portrait d'un pathogène opportuniste	24

II.3. Les infections à entérocoques – traitements et résistance aux antibiotiques	26
Chapitre III. Le métabolisme redox des entérocoques	26
III.1. L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) extracellulaire	26
III.1.1. Mécanisme de production de l' $O_2^{\cdot-}$ chez <i>E. faecalis</i>	26
III.1.2. Implication de l' $O_2^{\cdot-}$ dans le développement de cancers colorectaux	27
III.2. Les activités antioxydantes d' <i>E. faecalis</i>	30
III.3. Relation entre le stress oxydatif et la tolérance aux antibiotiques chez les entérocoques	31
Chapitre IV. Objectifs du travail de thèse	33
Matériel et méthodes	34
Chapitre I. Souches bactériennes et plasmides	35
Chapitre II. Techniques d'analyses physiologiques	37
II.1. Milieux de culture	37
II.2. Détermination des survies	38
II.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices	39
Chapitre III. Techniques de biochimie	39
III.1. Dosage de l' H_2O_2	39

III.2. Dosage de l'O ₂ ^{·-} extracellulaire	40
Chapitre IV. Techniques de biologie moléculaire	41
IV.1. Construction du mutant <i>menB</i> chez la souche d' <i>E. faecalis</i> JH2-2	41
IV.2. Mutagenèse dirigée par double recombinaison homologue chez <i>E. faecium</i>	41
IV.3. Extractions des acides nucléiques	42
IV.4. Réactions de polymérisation en chaîne	43
IV.5. Restrictions et ligatures de l'ADN	45
IV.6. Transformation d' <i>E. coli</i> et des entérocoques par électroporation	45
IV.7. Séquençage de l'ADN	47
Résultats et discussion	48
Chapitre I. Résumé de la publication	49
Chapitre II. Publication	49
Chapitre III. Résultats complémentaires et discussion	77
III.1. Contribution des hydrolases du peptidoglycane dans l'activité bactériolytique de l'amoxicilline	77
III.2. Une production de ROS indépendante des classes de protéines liant les pénicillines inactivées par les β-lactamines	83

III.3. Comment l'H₂O₂ conduit-il à la mort cellulaire du mutant <i>sodA</i> ?	83
III.4. Relation entre le stress oxydatif et l'action de la céfotaxime chez <i>E. faecium</i>, l'autre espèce d'entérocoques d'intérêt clinique	85
Conclusion générale et perspectives	89
Références bibliographiques	93
Annexe	102

Abréviations

Amx	:	amoxicilline
CAT	:	catalase
CMI	:	concentration minimale inhibitrice
CRC	:	cancer colorectal (<i>colorectal cancer</i>)
Ctx	:	céfotaxime
DMK	:	déméthylménaquinone
DMKH₂	:	DMK réduite
Fe²⁺	:	fer ferreux
FUM	:	fumarate
GM17	:	M17 dans lequel le lactose est remplacé par du glucose 0,3%
H₂O₂	:	peroxyde d'hydrogène
HEM	:	hématine
HPF	:	3'-(<i>p</i> -hydroxyphenyl) fluorescéine
O₂	:	oxygène
O₂·⁻	:	superoxyde
OH·	:	radical hydroxyle
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
PBP	:	protéine liant les pénicillines (<i>penicillin binding protein</i>)
PCR	:	réactions de polymérisation en chaîne (<i>polymerase chain reaction</i>)
PMF	:	force proton-motrice (<i>proton motive force</i>)
ROS	:	espèces réactives de l'oxygène (<i>reactive oxygen species</i>)
SOD	:	superoxyde dismutase
TCA	:	cycle de l'acide citrique (<i>tricarboxylic acid cycle</i>)

Liste des figures

Figure 1.	Décès annuels imputables à la résistance aux antimicrobiens (AMR pour <i>antimicrobial resistance</i>) comparativement aux autres causes majeures de décès.	12
Figure 2.	Etapes de réduction de l'oxygène moléculaire en eau.	14
Figure 3.	Inactivation d'un groupement fer-soufre d'une déshydratase par l' $O_2^{\cdot-}$.	17
Figure 4.	Modèle d'un mécanisme contribuant à la mort cellulaire provoquée par les antibiotiques bactéricides.	19
Figure 5.	Arbre phylogénétique construit à partir des séquences ARNr 16S disponibles pour chaque espèce du genre <i>Enterococcus</i> .	23
Figure 6.	Modèle proposé pour la production d' $O_2^{\cdot-}$ extracellulaire chez <i>E. faecalis</i> .	28
Figure 7.	Voie de biosynthèse de composés aromatiques indiquant le chorismate comme carrefour dans les chaînes de production des acides aminés aromatiques et de DMK.	29
Figure 8.	Modèle proposé pour l'action des antibiotiques bactéricides chez <i>E. faecalis</i> .	32
Figure 9.	Activité bactéricide par l'amoxicilline à 0,5 µg/ml indépendante des ROS.	79
Figure 10.	Cinétique de bactériolyse par l'amoxicilline à 0,5 µg/ml.	80

Figure 11.	Cinétique de bactériolyse par l'amoxicilline à 0,25 µg/ml.	81
Figure 12.	Détection d'H ₂ O ₂ selon la dose d'amoxicilline utilisé pour le traitement.	82
Figure 13.	Corrélation entre l'H ₂ O ₂ et la mortalité, spécifique au mutant <i>sodA</i> .	84
Figure 14.	Mortalité du mutant <i>sodA</i> indépendante de l'OH· ?	85
Figure 15.	Sensibilité à la céfotaxime du mutant <i>sodA</i> chez <i>E. faecium</i> .	87
Figure 16.	Modèle du mécanisme de production d'O ₂ · ⁻ extracellulaire stimulé par les β-lactamines chez <i>E. faecalis</i> .	91

Liste des tableaux

Tableau 1.	Agents pathogènes (et leurs résistances aux antibiotiques) prioritaires pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques.	13
Tableau 2.	Répartition et classement des agents pathogènes impliqués dans des infections associées aux soins fréquemment signalés au National Healthcare Safety Network (NHSN), 2011–2014.	25
Tableau 3.	Protéines jouant (ou susceptibles de jouer) un rôle dans la réponse au stress oxydatif et leur présence chez <i>E. faecalis</i> .	30
Tableau 4.	Souches bactériennes utilisées dans cette étude.	35
Tableau 5.	Plasmides utilisés dans cette étude.	36
Tableau 6.	Composition du milieu LB.	37
Tableau 7.	Composition du milieu GM17.	38
Tableau 8.	Séquences des oligonucléotides utilisés dans cette étude.	44
Tableau 9.	Protéines jouant (ou susceptibles de jouer) un rôle dans la réponse au stress oxydatif et leur présence chez les souches d' <i>E. faecalis</i> V583 et d' <i>E. faecium</i> AUS0004.	86

Analyse bibliographique

Analyse bibliographique

Chapitre I. Relation entre le stress oxydatif et l'action des antibiotiques

L'émergence de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques, ajoutée aux difficultés liées au développement de nouveaux antibiotiques, constituent une menace pour la santé humaine mondiale. En effet, la résistance aux antibiotiques « provoque le décès » d'environ 700 000 personnes chaque année dans le monde, et certains experts prédisent que ce nombre pourrait atteindre 10 millions en 2050 si aucune action n'est entreprise (Figure 1).

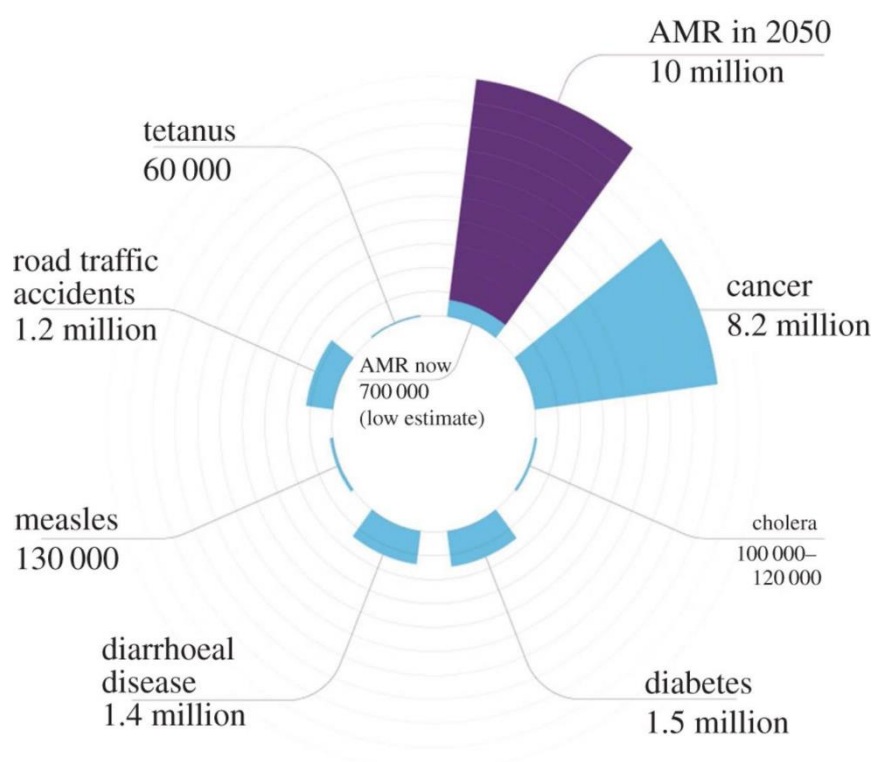


Figure 1. Décès annuels imputables à la résistance aux antimicrobiens (AMR pour *antimicrobial resistance*) comparativement aux autres causes majeures de décès. Source : Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. Review on Antimicrobial Resistance (2014).

Il y a un an, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) publiait une liste de pathogènes prioritaires pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques (rapport OMS, 2017). Les 4 bactéries ou familles bactériennes les plus inquiétantes et qui arrivent en tête de cette liste sont responsables d'infections associées aux soins et comprennent *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, les *Enterobacteriaceae* produisant des β -lactamases à spectre étendu et *Enterococcus faecium* (résistant à la vancomycine) (Tableau 1).

Tableau 1. Agents pathogènes (et leurs résistances aux antibiotiques) prioritaires pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques. Source : OMS (2017).

<i>Acinetobacter baumannii</i> (carbapénème)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (carbapénème)
<i>Enterobacteriaceae</i> produisant des β -lactamases à spectre étendu (carbapénème)
<i>Enterococcus faecium</i> (vancomycine)
<i>Staphylococcus aureus</i> (mécicilline, vancomycine)
<i>Helicobacter pylori</i> (clarithromycine)
<i>Campylobacter</i> spp. (fluoroquinolone)
<i>Salmonellae</i> (fluoroquinolone)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (céphalosporine, fluoroquinolone)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (pénicilline)
<i>Haemophilus influenzae</i> (ampicilline)
<i>Shigella</i> spp. (fluoroquinolone)

Par conséquent, la nécessité de découvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation d'antibiotiques implique notamment une meilleure compréhension de leurs mécanismes d'action. Les principales classes d'antibiotiques agissent sur les bactéries en inhibant des fonctions physiologiques précises telles que la synthèse de la paroi (β -lactamines), la réplication/transcription de l'ADN (quinolones) ou encore la synthèse protéique (aminoglycosides) (Walsh, 2003). Cependant, les causes physiologiques responsables de la mort cellulaire induite par les antibiotiques sont moins bien comprises.

Au cours de cette dernière décennie, des études menées chez de nombreuses bactéries ont suggéré que les interactions entre les antibiotiques et leur cible ne peuvent expliquer à elles seules leur activité bactéricide. En effet, plusieurs travaux ont montré qu'une part de la mortalité cellulaire suite à la liaison antibiotique/cible pouvait être attribuée à des perturbations métaboliques, parmi lesquelles la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *reactive oxygen species*), à l'origine d'un stress oxydatif [voir Dwyer *et al.* (2015) pour une récente revue]. Cependant, ces résultats ont été remis en cause par une partie de la communauté scientifique (voir section I.4).

I.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

La notion de stress oxydatif a été introduite et définie par Sies en 1985 comme « une perturbation de la balance pro-/anti-oxydant en faveur de ces derniers ». Si l'oxygène moléculaire (O_2) est plutôt stable, sa réduction univalente, due aux activités métaboliques de la cellule, conduit à la formation de ROS, hautement réactives. L'augmentation du taux de ROS dans la cellule, à l'origine d'un stress oxydatif, est la conséquence de réductions successives de l' O_2 . Par transfert d'un électron, l'oxygène est d'abord réduit en anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), lui-même réduit pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), à son tour réduit en radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) (Figure 2).

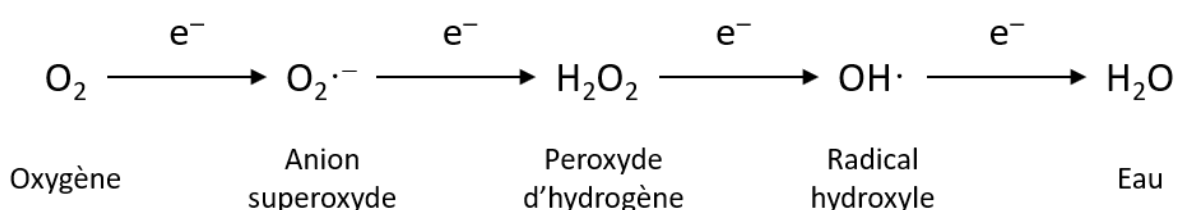


Figure 2. Étapes de réduction de l'oxygène moléculaire en eau.

Ces ROS peuvent directement interagir avec des composés cellulaires tels que l'ADN, les protéines ou les lipides membranaires, et entraîner ainsi un arrêt de la croissance ou même la mort de la cellule. Pour faire face aux (effets délétères des) ROS, les bactéries ont développé de nombreux systèmes de défense (enzymatiques ou non), lesquels comprennent notamment

des enzymes de détoxification telles que les superoxydes dismutases (SOD), les catalases et les peroxydases.

I.2. Premières mises en évidence de l'induction d'un stress oxydatif comme composante du mode d'action des antibiotiques

Les premières conclusions affirmant l'induction d'un stress oxydatif suite à l'action d'un antibiotique ont été rapportées par Arriaga–Alba *et al.* en 2000. Leur étude montre que le traitement de souches de *Salmonella Typhimurium* par des quinolones induit une mutagenèse, tandis que le β -carotène, utilisé comme antioxydant, les en protège (Arriaga–Alba *et al.*, 2000). En 2002, Becerra et Albasa ont étudié l'effet de la ciprofloxacine (quinolone) sur la production de $O_2^{\cdot-}$ chez *Staphylococcus aureus*. Le traitement par la ciprofloxacine induit une accumulation plus importante d' $O_2^{\cdot-}$ intracellulaire chez l'ensemble des souches testées. De plus, cette accumulation est relativement plus importante chez les souches sensibles à l'antibiotique comparativement à celles qui y sont résistantes. Ces observations les ont amenés à proposer que la ciprofloxacine induit un stress oxydatif et que celui-ci peut participer à son action bactéricide (Becerra et Albasa, 2002). Cette hypothèse a été soutenue et étendue à d'autres espèces bactériennes. En effet, des souches de *S. aureus*, d'*Escherichia coli* et d'*Enterococcus faecalis* sensibles à la ciprofloxacine subissent un stress oxydatif lorsqu'elles sont incubées avec cet antibiotique contrairement à celles qui y sont résistantes. De même, l'application de la ceftazidime et de la pipéracilline induit un stress oxydatif chez des souches de *P. aeruginosa* sensibles uniquement (Albasa *et al.*, 2004).

En 2006, Becerra et ses collaborateurs ont rapporté que l'oxydation des lipides et des nucléotides, induite par la ciprofloxacine, est plus importante chez la souche de *S. aureus* ATCC 29213 sensible à l'antibiotique que chez une souche résistante. Par ailleurs, il a été montré que le glutathion et l'acide ascorbique, utilisés comme antioxydants, protègent de manière importante *E. coli* contre la ciprofloxacine (Goswami *et al.*, 2006). Enfin, la sensibilité accrue vis-à-vis de la ciprofloxacine de mutants déficients en Superoxyde dismutase (SodC), Catalase (KatE et KatG) et/ou Alkyl hydroperoxyde réductase (AhpCF) a conduit ces mêmes auteurs à émettre l'hypothèse que des ROS semblent impliqués dans l'action antibactérienne de cette fluoroquinolone (Goswami *et al.*, 2006).

I.3. Modèle d'un mécanisme contribuant à la mort cellulaire induite par les antibiotiques bactéricides

Afin de caractériser les mécanismes moléculaires aboutissant à la mort cellulaire des bactéries suite à un traitement antibiotique, des analyses d'expression génique basées sur l'utilisation de puces à ADN ont été entreprises par Dwyer et ses collaborateurs en 2007. Ce travail avait pour objectif l'étude de la réponse d'*E. coli* soumise à l'action de la norfloxacine, antibiotique inhibiteur de l'ADN gyrase, ou à la présence du peptide CcdB, composant du système toxine–antitoxine CcdB–CcdA et connu pour avoir le même effet sur cette enzyme (Maki *et al.*, 1992). Ces analyses révèlent notamment que l'inhibition de la gyrase induit des modifications significatives de l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif (*SoxRS* et *SodA*), l'incorporation et l'utilisation du fer, la synthèse de groupements fer–soufre ainsi que la réparation de l'ADN (Dwyer *et al.*, 2007). Lors de la réaction de Fenton, l'interaction de l' H_2O_2 avec le fer ferreux (Fe^{2+}) mène à la formation de l' $\text{OH}\cdot$ hautement réactif. L' $\text{O}_2\cdot^-$, en endommageant les groupements fer–soufre des complexes protéiques libère du Fe^{2+} (Figure 3) qui peut ainsi jouer un rôle critique dans la génération d' $\text{OH}\cdot$ (Imlay, 2003). Les auteurs ont donc suggéré qu'une production d' $\text{OH}\cdot$ pourrait contribuer à l'activité bactéricide des inhibiteurs de l'ADN gyrase (Dwyer *et al.*, 2007). Cette hypothèse a été étayée par la détection d' $\text{OH}\cdot$ chez des cellules d'*E. coli* traitées par la norfloxacine ou exprimant le peptide CcdB, au moyen du réactif fluorescent 3'-(*p*-hydroxyphenyl) fluorescéine (HPF), lequel présente une forte spécificité *in vitro* pour ce ROS (Setsukinai *et al.*, 2003). De plus, l'augmentation de la fluorescence peut être atténuée par l'addition du chélateur de fer *o*-phénanthroline, utilisé pour diminuer la disponibilité du fer ferreux et ainsi limiter la réaction de Fenton (Dwyer *et al.*, 2007).

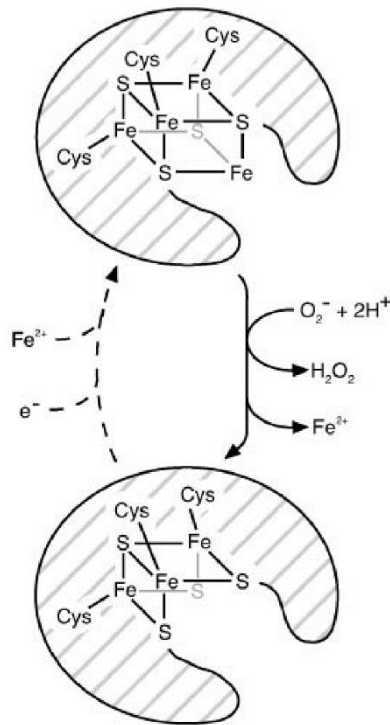


Figure 3. Inactivation d'un groupement fer-soufre d'une déshydratase par l'O₂⁻. La ligne en pointillés suggère les étapes impliquées dans le processus de réparation. Fe : fer, Cys : cystéine, S : soufre, hachures : protéine. D'après Imlay *et al.*, 2003.

Ces travaux ont conduit Kohanski *et al.* (2007) à s'interroger sur l'éventuelle formation d'OH[·] induite par d'autres classes d'antibiotiques chez les bactéries gram-positives et négatives. En utilisant le réactif HPF comme indicateur fluorescent de stress oxydatif, les auteurs ont constaté que l'ampicilline (β-lactamine), la norfloxacin (quinolone) et la kanamycine (aminoglycoside) induisent une augmentation de l'intensité du signal chez *E. coli* et *S. aureus* (Kohanski *et al.*, 2007) suggérant là encore une production du radical OH[·]. Pour démontrer que la formation d'OH[·] contribue à la mort cellulaire induite par ces trois antibiotiques chez *E. coli*, les cellules ont été traitées avec chacun d'entre eux en présence du chélateur de fer 2,2'-bipyridyle, utilisé comme l'o-phénanthroline pour limiter la réaction de Fenton (Kohanski *et al.*, 2007). Pour les trois classes d'antibiotiques, une augmentation de la survie bactérienne est observée suite à l'addition du 2,2'-bipyridyle. Leur activité bactéricide est également réduite par l'addition de thiourée, un chélateur d'OH[·] connu pour limiter les dommages causés par ce ROS chez les eucaryotes et les procaryotes (Novogrodsky *et al.*, 1982 ; Repine *et al.*, 1981 ; Touati *et al.*, 1995). D'autre part, la délétion du gène *recA*, impliqué dans

la réparation de l'ADN, sensibilise les cellules d'*E. coli* aux trois antibiotiques. Ces résultats suggèrent que la contribution de l' $\text{OH}\cdot$ dans l'activité bactéricide des antibiotiques implique des dommages à l'ADN qui peuvent être atténués par des mécanismes dépendant de RecA (Kohanski *et al.*, 2007).

Chez *E. coli*, la génération d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ et de ROS dérivés se produit en partie par la chaîne respiratoire stimulée par l' O_2 et les cofacteurs de transport d'électrons NADH. En aérobiose, ce dernier est principalement généré dans les cellules à partir du NAD^+ à travers le métabolisme de sources de carbone et notamment le cycle de l'acide citrique (TCA pour *tricarboxylic acid cycle* – Cronan et Laport, 2005). Des analyses physiologiques révèlent que la délétion de gènes codant des enzymes intervenant dans le TCA diminue l'activité bactéricide des antibiotiques (Kohanski *et al.*, 2007). L'ensemble de ces résultats a permis aux auteurs de proposer un modèle (Figure 4) dans lequel l'interaction entre les antibiotiques et leur cible cellulaire stimule, *via* une hyperactivation de la chaîne respiratoire, la formation de ROS qui endommagent des macromolécules telles que l'ADN, occasionnant la mort cellulaire (Kohanski *et al.*, 2007).

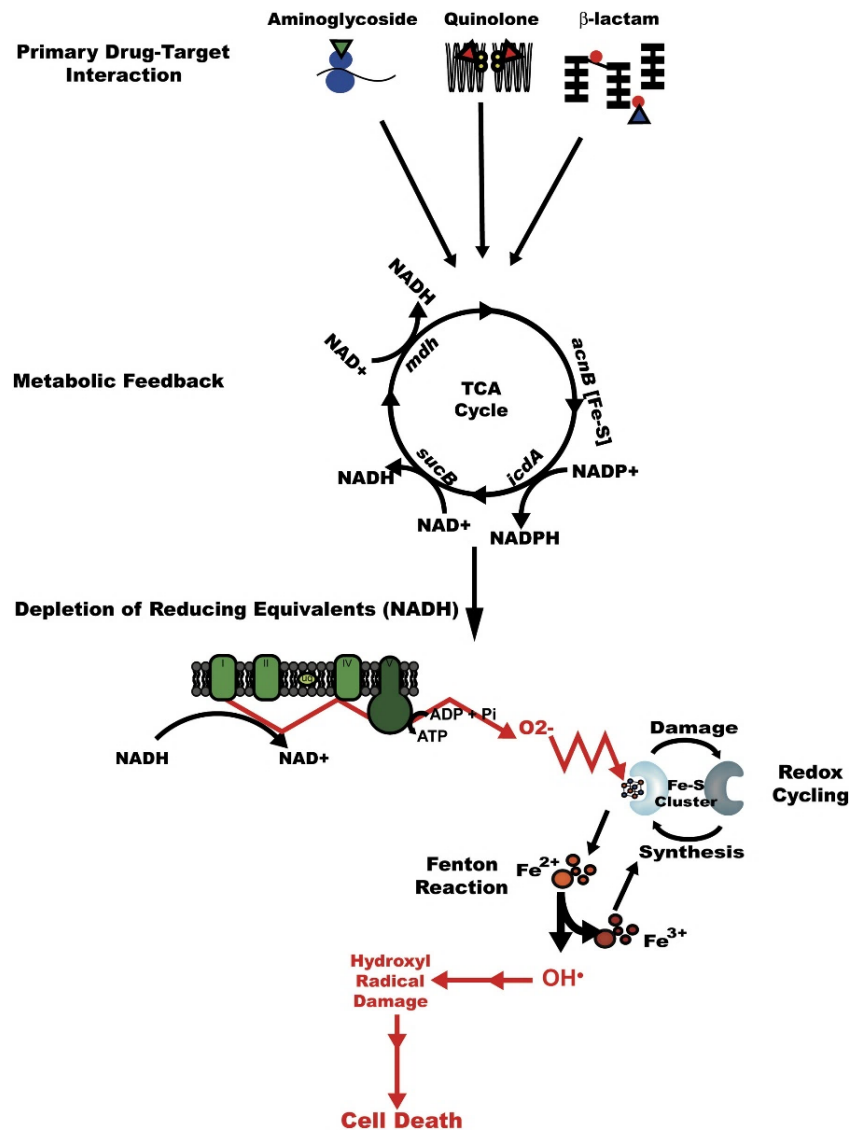


Figure 4. Modèle d'un mécanisme contribuant à la mort cellulaire provoquée par les antibiotiques bactéricides. Les interactions entre les antibiotiques et leurs cibles primaires stimulent l'oxydation des cofacteurs réduits NADH *via* la chaîne de transport des électrons qui dépend du TCA. L'hyperactivation de la chaîne de transport des électrons stimule la formation d'O₂^{•-} qui endommage les groupements fer-soufre des complexes protéiques, rendant le Fe²⁺ disponible pour l'oxydation par la réaction de Fenton. Celle-ci conduit à la formation d'OH[•] libre très réactif et à qui on attribue un fort potentiel de dommages sur des cibles telles que l'ADN, les protéines et les lipides, aboutissant à la mort cellulaire. D'après Kohanski *et al.*, 2007.

I.4. Un modèle controversé

Le modèle de Kohanski *et al.* (2017) proposant un mécanisme de mort cellulaire par les antibiotiques bactéricides faisant intervenir un stress oxydatif a été remis en cause par plusieurs études. En effet, ce possible mode d'action a notamment fait réagir deux équipes qui contestent l'induction d'un stress oxydatif comme composante de l'action des antibiotiques (Keren *et al.*, 2013 ; Liu et Imlay, 2013). Les chercheurs de chacune des deux équipes indiquent que l'activité bactéricide de l'ampicilline ou de la norfloxacine est similaire en aérobiose et en anaérobiose, condition dans laquelle les ROS ne peuvent être produits. Suite à un traitement par la kanamycine, la mortalité des cellules est plus accentuée en présence d'O₂. Cependant, la pénétration de la kanamycine et autres aminoglycosides est en partie gouvernée par l'amplitude de la force proton-motrice (PMF pour *proton motive force*). Ainsi, la respiration aérobie, en générant cette PMF facilite l'entrée de la kanamycine dans la cellule, lui permettant d'interagir avec sa cible primaire, le ribosome, et d'exercer son pouvoir bactéricide. L'absence d'O₂ et d'autre substrat respiratoire diminue la PMF et par conséquent la toxicité de l'antibiotique. Lorsque du nitrate est fourni comme substrat respiratoire, la PMF est amplifiée et l'activité bactéricide de la kanamycine partiellement restaurée, malgré l'absence d'O₂. Ainsi les effets de l'O₂ sur l'action de la kanamycine relèvent de son incorporation *via* la génération de la PMF, plutôt que d'une production de ROS (Keren *et al.*, 2013 ; Liu et Imlay, 2013).

L'OH·, au centre du modèle de Kohanski *et al.* (2007) pour sa capacité à endommager l'ADN, est formé dans les cellules lorsque le Fe²⁺ transfère des électrons à l'H₂O₂ selon la réaction de Fenton. Cependant, les traitements antibiotiques n'ont ni augmenté la production d'H₂O₂, ni les concentrations intracellulaires de fer libre. De plus, la sensibilité aux antibiotiques d'un mutant d'*E. coli* dans lequel le gène *recA* est inactivé n'est pas dépendante de l'O₂, ce qui contredit l'idée d'une toxicité associée à des lésions oxydatives de l'ADN (Liu et Imlay, 2013). Par ailleurs, la relation entre l'OH·, détecté au moyen du réactif HPF, et la mortalité d'*E. coli* suite à un traitement antibiotique a été examinée. Bien que les antibiotiques induisent une augmentation de l'intensité du signal, aucune corrélation n'a été trouvée entre la probabilité de survie d'une cellule bactérienne suite au traitement et son niveau de ROS (Keren *et al.*, 2013). Ainsi, ces résultats ne soutiennent pas le mécanisme de mort cellulaire par les antibiotiques bactéricides faisant intervenir un stress oxydatif.

D'autres travaux contribuent également à la controverse du rôle des ROS dans l'activité bactéricide de la gentamicine et de l'ampicilline (Ezraty *et al.*, 2013). Ces derniers révèlent que des mutants d'*E. coli* délétés des gènes codant les deux superoxydes dismutases SodA et SodB ou le régulateur transcriptionnel de stress oxydatif OxyR, hypersensibles à l' $O_2^{\cdot-}$ et à l' H_2O_2 respectivement, ne sont pas plus sensibles à ces deux antibiotiques que la souche parentale. Les auteurs montrent que la chaîne de transport d'électrons et les groupements fer-soufre des complexes protéiques sont importants pour l'activité bactéricide de la gentamycine, indépendamment de la formation de ROS. Les complexes fer-soufre sont essentiels à l'activité bactéricide de l'aminoglycoside parce qu'ils permettent la maturation de la chaîne respiratoire et par conséquent, l'établissement d'une PMF, nécessaire à l'incorporation de l'antibiotique. Ainsi, les chélateurs de fer protègent *E. coli* contre les aminoglycosides, non pas parce qu'ils diminuent la disponibilité du fer et limitent la réaction de Fenton, mais parce qu'ils bloquent leur pénétration (Ezraty *et al.*, 2013).

Bien que ces travaux contestent le modèle de Kohanski *et al.*, depuis 2007, de nombreuses études ont également rapporté des observations soutenant la contribution des ROS dans l'activité bactéricide des antibiotiques chez une grande variété d'agents pathogènes (Dwyer *et al.*, 2015).

Chapitre II. Le genre *Enterococcus*

II.1. Caractères généraux du genre *Enterococcus*

II.1.1. Historique

Dans son rapport à la société française de biologie en 1899, Thiercelin partage ses observations d'une bactérie à Gram positif, de forme sphérique et de type diplocoque. Il lui donna le nom d'*Enterococcus* pour souligner sa morphologie et son origine intestinale (Thiercelin, 1899). La même année, McCallum et Hastings caractérisaient un organisme responsable d'une endocardite fatale qu'ils ont appelé *Micrococcus zymogenes*, maintenant connu comme *E. faecalis*. Par la suite, Andrewes et Horder (1906) ont nommé

Streptococcus faecalis un organisme ayant des caractéristiques similaires à celles de la bactérie décrite par Thiercelin (1899). En 1919, Orla-Jensen a rapporté la première description de *Streptococcus faecium*, qui différait des profils de fermentation décrits pour *S. faecalis*. Dans son article de revue consacré au genre *Streptococcus* en 1937, Sherman a employé le terme « *Enterococcus* » pour indiquer les streptocoques du groupe D. Le genre *Enterococcus* a été réintroduit en 1984 par des expériences d'hybridation ADN-ADN et d'analyse de séquences d'ARNr 16S qui ont permis de montrer que les deux genres *Enterococcus* et *Streptococcus* sont phylogénétiquement distincts (Schleifer et Kilpper-Balz, 1984).

II.1.2. Phylogénie du genre *Enterococcus*

Actuellement, le genre *Enterococcus* comprend 47 espèces (Van Tyne et Gilmore, 2014). La phylogénie du genre *Enterococcus* est illustrée dans la figure 5. Cependant, l'évolution des techniques d'identification physiologique, ainsi que l'intérêt grandissant pour ce groupe de bactéries laissent augurer d'autres réarrangements possibles dans la taxonomie de ce genre.

II.1.3. Caractéristiques morphologiques et physiologiques du genre *Enterococcus*

Les entérocoques sont des bactéries à Gram positif à bas GC% de forme sphérique ou ovoïde, dont le diamètre varie de 0,6 à 2,5 µm, qui se présentent isolées ou organisées en paires ou en chaînettes plus ou moins longues (Thiercelin, 1899). Ce sont des anaérobies facultatifs, majoritairement immobiles et incapables de synthétiser une endospore. Ils sont considérés comme catalase négatifs bien que le gène codant cette enzyme soit présent au sein de leur génome (Frankenberg *et al.*, 2002). Les entérocoques sont généralement homofermentaires, produisant essentiellement de l'acide lactique comme produit final de la fermentation du glucose.

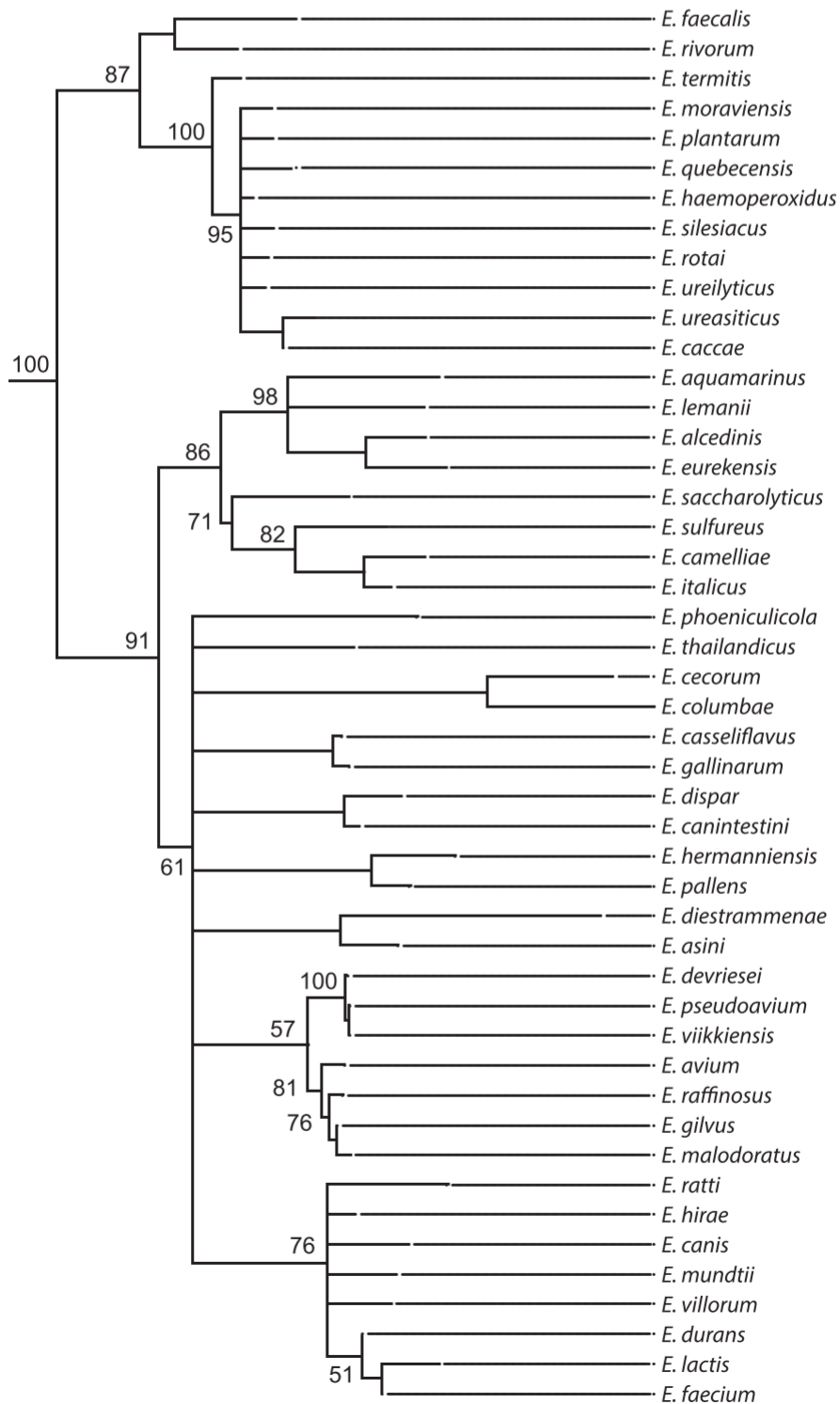


Figure 5. Arbre phylogénétique construit à partir des séquences ARNr 16S disponibles pour chaque espèce du genre *Enterococcus*. D'après Van Tyne et Gilmore, 2014.

Selon les critères physiologiques ayant servi à la classification de Sherman en 1937, les entérocoques se démarquent des autres streptocoques par leur aptitude à se développer dans des conditions défavorables. Ainsi, ils peuvent se développer à des températures comprises entre 10 et 45°C (avec une température optimale de croissance de 35°C), dans des conditions où le pH est ajusté à 9,6, sur des milieux contenant 6,5% de chlorure de sodium ou 40% de bile de bœuf, survivre à un chauffage de 30 minutes à 60°C (pasteurisation basse) ou à une congélation prolongée (Facklam, 1973 ; Sherman, 1937).

II.1.4. Habitats des entérocoques

Les entérocoques sont des bactéries ubiquitaires ; ils peuvent être présents dans l'environnement (les eaux usées, l'eau douce, l'eau de mer, le sol, sur les végétaux...) mais ils sont majoritairement retrouvés dans le tractus gastro-intestinal humain et animal. *E. faecalis* et *E. faecium* sont les entérocoques les plus couramment identifiés à partir de la flore du tractus gastro-intestinal humain (Fisher et Phillips, 2009).

II.2. Portrait d'un pathogène opportuniste

Bien que faisant partie de la flore intestinale de l'homme, les entérocoques peuvent être à l'origine de différentes infections chez une fraction sensible de la population comme les immunodéprimés, les nourrissons, les personnes âgées et les patients des centres de soins intensifs (Arias et Murray, 2012 ; Fisher et Phillips, 2009 ; Miller *et al.*, 2016). Une récente enquête sur les organismes responsables d'infections associées aux soins révèle que les entérocoques arrivent en deuxième position (14,7%), devant *S. aureus* (11,8%), des pathogènes les plus communément isolés aux États-Unis (Tableau 2 – Weiner *et al.*, 2016). L'exploitation des résultats de l'enquête consignée dans le tableau 2 révèle que les infections à entérocoques sont majoritairement provoquées par deux espèces : *E. faecalis* pour ~50% des cas et *E. faecium* pour environ ~25% (Weiner *et al.*, 2016). Les symptômes qu'elles engendrent regroupent des infections urinaires, des endocardites, des abcès intra abdominaux, des infections pelviennes et des tissus mous ainsi que des bactériémies (Arias et Murray, 2012 ; Fisher et Phillips, 2009 ; Miller *et al.*, 2016 ; Weiner *et al.*, 2016). Hormis *E. faecalis* et *E. faecium*, d'autres entérocoques responsables d'infections chez l'homme sont également connus. Il s'agit de :

Enterococcus avium, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*,
Enterococcus durans, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus raffinosus* et *Enterococcus mundtii*
(Na *et al.*, 2012 ; Patel, 2003 ; Swampillai *et al.*, 2012 ; Vijayakrishnan et Rapose, 2012).

Tableau 2. Répartition et classement des agents pathogènes impliqués dans des infections associées aux soins fréquemment signalés au National Healthcare Safety Network (NHSN), 2011–2014. Adapté de Weiner *et al.*, 2016.

Pathogen	No. (%) of pathogens	Rank ^b
<i>Escherichia coli</i>	62,904 (15.4)	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	48,302 (11.8)	2
<i>Klebsiella (pneumoniae/oxytoca)</i>	31,498 (7.7)	3
Coagulase-negative staphylococci ^c	31,361 (7.7)	4
<i>Enterococcus faecalis</i> ^d	30,034 (7.4)	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29,636 (7.3)	6
<i>Candida albicans</i> ^d	27,231 (6.7)	7
<i>Enterobacter</i> spp. ^c	17,235 (4.2)	8
<i>Enterococcus faecium</i> ^d	14,942 (3.7)	9
Other <i>Enterococcus</i> spp. ^d	14,694 (3.6)	10
<i>Proteus</i> spp. ^c	11,249 (2.8)	11
Yeast NOS ^e	10,811 (2.6)	12
Other <i>Candida</i> spp. ^d	10,641 (2.6)	13
<i>Candida glabrata</i> ^d	8,121 (2.0)	14
<i>Bacteroides</i> spp.	7,560 (1.9)	15
Other pathogen	51,932 (12.7)	
Total	408,151 (100)	

^bLes 15 pathogènes les plus communs sont listés dans ce tableau et classés selon la fréquence à laquelle ils ont été signalés au NHSN. Les classements ont été établis en fonction de tous les agents pathogènes déclarés.

^cParmi toutes les infections associées aux soins, les espèces suivantes ont été fréquemment signalées mais considérées comme faisant partie d'un groupe pathogène plus important pour ce tableau : *Staphylococcus epidermidis* (12 562 pathogènes signalés), *Enterobacter cloacae* (11 269), et *Proteus mirabilis* (10 559).

^dClassés au niveau de leur genre, les entérocoques (*E. faecalis*, *E. faecium*, et autres espèces) ont été deuxième au classement et toutes les espèces de *Candida* (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, et autres espèces) quatrième.

NOS, non spécifiés ailleurs.

II.3. Les infections à entérocoques – traitements et résistance aux antibiotiques

L'importance clinique du genre *Enterococcus* est directement liée à sa résistance aux antibiotiques, laquelle contribue au risque de colonisation et d'infection. Les entérocoques sont intrinsèquement résistants à de nombreux agents antibactériens couramment utilisés tels que les aminoglycosides (à bas niveau), les céphalosporines (à haut niveau) et les fluoroquinolones (Ogier et Serror, 2008). En plus de la résistance intrinsèque, des résistances peuvent également être acquises par le biais de transferts génétiques permettant de faire face aux trois grandes classes d'antibiotiques utilisées dans le traitement des infections à entérocoques que sont les pénicillines, les glycopeptides et les aminoglycosides (Foulquié Moreno *et al.*, 2006 ; Franz *et al.*, 1999 ; Ogier et Serror, 2008). En réponse à ces événements de transferts génétiques qui réduisent considérablement les choix thérapeutiques, une part des efforts de recherches actuelles porte sur le développement de nouveaux antibiotiques. Cependant, des résistances à ces agents sont toujours susceptibles de se déclarer (Miller *et al.*, 2016).

Chapitre III. Le métabolisme redox des entérocoques

III.1. L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) extracellulaire

III.1.1. Mécanisme de production de l' $O_2^{\cdot-}$ chez *E. faecalis*

E. faecalis produit de l' $O_2^{\cdot-}$ extracellulaire et des ROS dérivés, tels l' H_2O_2 et l' $OH^{\cdot}$ (Falcioni *et al.*, 1981 ; Huycke *et al.*, 1996, 2001). Ce trait métabolique relatif à la production de ROS, décrit chez certaines cellules eucaryotes, notamment les leucocytes (Babior, 1999), est inhabituel chez les procaryotes et n'est connu que pour *E. faecalis*, quelques souches d'autres espèces d'entérocoques (*E. faecium*, *E. casseliflavus* ATCC 25788 et *E. gallinarum* ATCC 35038), *Lactococcus lactis* (Huycke *et al.*, 1996) ainsi qu'*E. coli* dans une moindre mesure (Korshunov et Imlay, 2006). Bien qu'*E. coli* produise de l' $O_2^{\cdot-}$ extracellulaire, son taux

de production est approximativement 25 fois moindre que celui d'*E. faecalis* (Korshunov et Imlay, 2006).

Des expériences de mutagenèse aléatoire par transposition, puis de mutagenèse dirigée chez *E. faecalis* ont permis l'identification de déméthylménaquinones (DMK) associées à la membrane comme sources d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ extracellulaire. Le mécanisme le plus probable implique l'oxydation univalente des DMK réagissant spontanément avec l' O_2 pour former de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Figure 6). De plus, la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ extracellulaire est inhibée par de l'hématine exogène, un cofacteur essentiel pour le cytochrome *bd*, une quinol oxydase. Ainsi, lorsqu'*E. faecalis* est cultivée avec de l'hème en présence d' O_2 , le cytochrome devient fonctionnel et la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ est abolie. Vraisemblablement, le cytochrome *bd* réoxyde efficacement les DMK et minimise leur réactivité avec l' O_2 . De même, en présence de fumarate, la fumarate réductase (Frd), une autre quinol oxydase d'*E. faecalis* liée à la membrane, atténue également la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ extracellulaire (Huycke *et al.*, 2001).

III.1.2. Implication de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ dans le développement de cancers colorectaux

Pour mettre en évidence, d'une part, la production de ROS par *E. faecalis in vivo*, les voies intestinales de rats ont été colonisées soit par une souche sauvage d'*E. faecalis* soit par un mutant isogénique portant un gène *menB* inactivé pour lequel la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ est inhibée *in vitro*. Le gène *menB* code l'enzyme de production de l'acide 1,4-dihydroxy-2-naphtoïque, précurseur essentiel dans la voie de biosynthèse de DMK (Figure 7). L'étude comparative du contenu intestinal de rongeurs colonisés par la souche sauvage ou le mutant *menB* confirment la production de ROS par *E. faecalis* dans le tractus intestinal des mammifères par l'autoxydation de DMK. Ces observations indiquent qu'*E. faecalis* peut être une source potentielle de stress oxydant pour l'épithélium intestinal (Huycke et Moore, 2002).

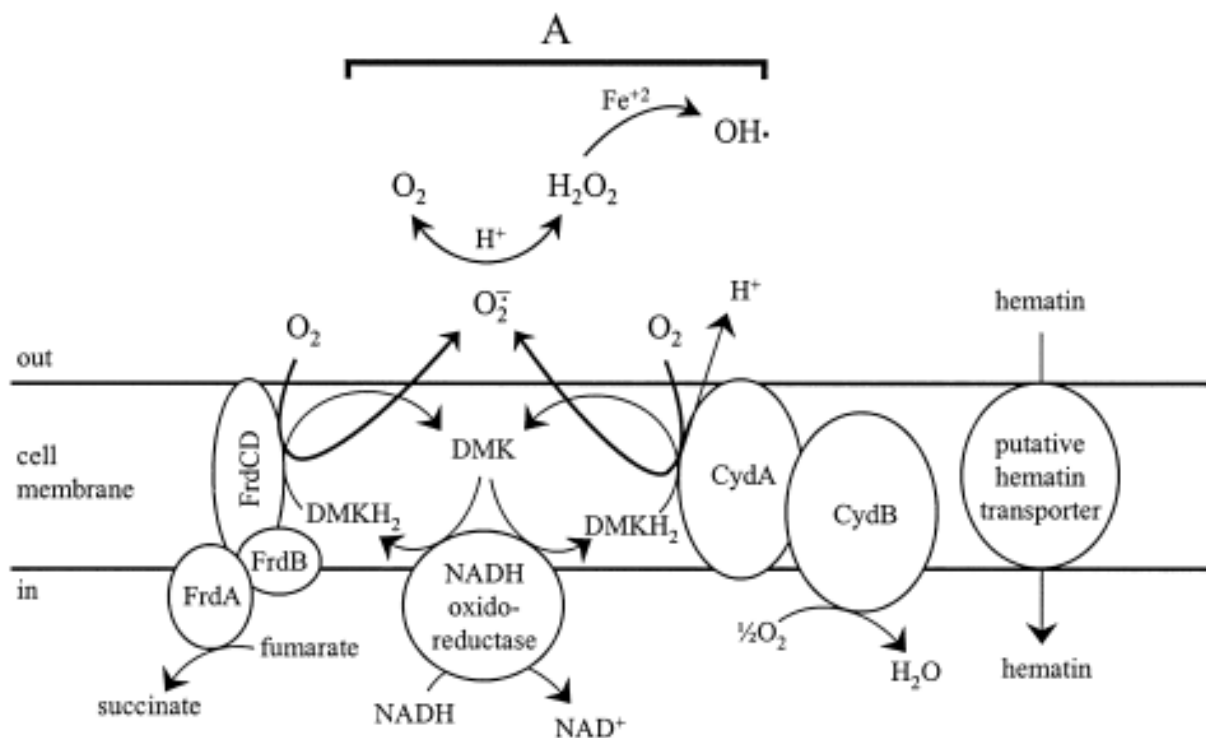


Figure 6. Modèle proposé pour la production d' $O_2^{\bullet-}$ extracellulaire chez *E. faecalis*.

Les cofacteurs de transport d'électrons produits par la fermentation des sucres se transfèrent du cytosol à la membrane cytoplasmique par des réactions d'oxydoréductions (pour simplifier, seule la NADH quinone oxydoréductase est montrée). La DMK réduite ($DMKH_2$) peut se lier à la quinol oxydase Frd terminale à travers les ancres polypeptidiques hydrophobes FrdCD. En présence de fumarate, les cofacteurs réducteurs passent à travers des complexes fer-soufre (FrdB) vers un domaine contenant du FAD et portant un site catalytique dicarboxylique (FrdA) qui permet de réduire le fumarate en succinate. Accessoirement, la $DMKH_2$ peut être oxydée par une deuxième quinol oxydase terminale sous la forme de cytochrome *bd* qui ne peut être catalytiquement activé que si de l'hématine exogène est transloquée vers le cytosol par un transporteur non identifié. L'hème b_{558} de CydA oxyde efficacement $DMKH_2$ en transférant les équivalents réducteurs aux hèmes b_{595} et *d* de CydB qui permet de réduire l' O_2 en eau. Cette oxydation de $DMKH_2$ libère des protons dans le compartiment extracellulaire et aide à établir une PMF. En absence de fumarate et d'hématine (A), l' $O_2^{\bullet-}$ extracellulaire est généré par l'autoxydation des radicaux semiquinones stabilisés (flèches épaisses) aux sites des quinol oxydases terminales (FrdCD et CydA), ou potentiellement, sur des sites d'autres enzymes associées à la membrane. Dans des conditions neutres ou acides, l' $O_2^{\bullet-}$ est facilement transformé en H_2O_2 et, en présence de métaux de transition comme le fer, il sera converti catalytiquement en $OH^{\bullet}$. D'après Huycke *et al.*, 2001.

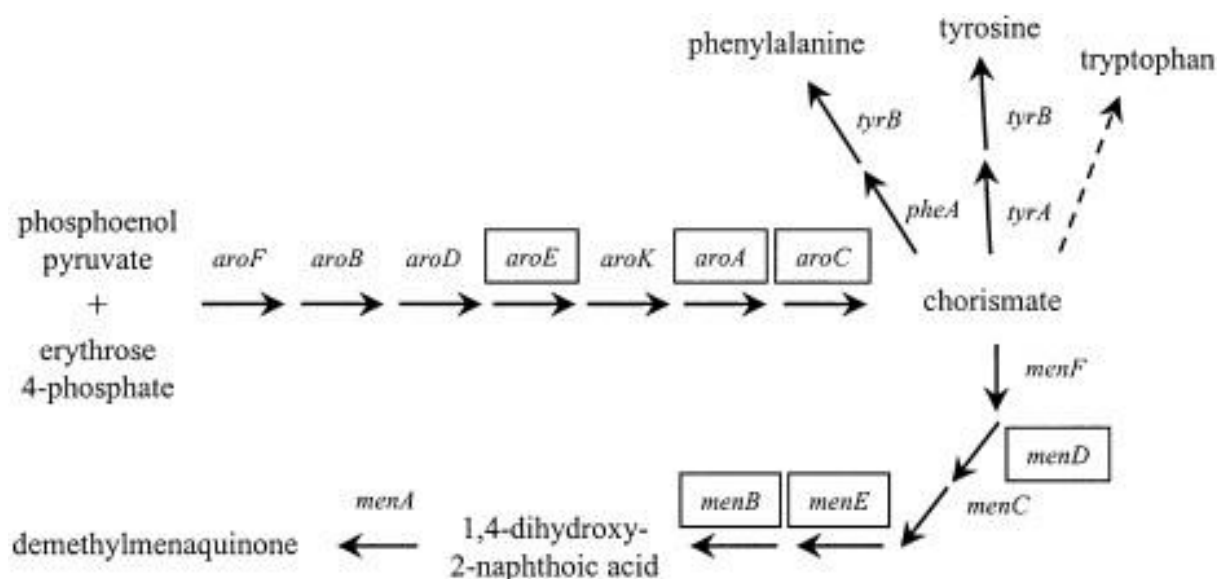


Figure 7. Voie de biosynthèse de composés aromatiques indiquant le chorismate comme carrefour dans les chaînes de production des acides aminés aromatiques et de DMK. Les gènes encadrés correspondent à ceux inactivés par insertion d'un transposon ou d'une cassette d'un gène de résistance aux antibiotiques en utilisant le vecteur p3erm. *E. faecalis* OG1RF est auxotrophe pour le tryptophane, et la flèche hachurée représente une absence ou une perte d'activité de ses gènes de biosynthèse. D'après Huycke *et al.*, 2001.

D'autre part, la capacité d'*E. faecalis* à endommager l'ADN des cellules eucaryotes a été examinée. Ainsi, les cellules de côlon de rats colonisés par une souche sauvage d'*E. faecalis* productrice d' $O_2^{\cdot-}$ montrent une augmentation significative de dommages de l'ADN comparativement à celles de rats contrôles traités dans les mêmes conditions par un mutant isogénique *menB* non producteur d' $O_2^{\cdot-}$ (Huycke *et al.*, 2002). La production d' $O_2^{\cdot-}$ extracellulaire par *E. faecalis* favorise également l'instabilité chromosomique dans des cellules de mammifères (Wang et Huycke, 2007). Enfin, des souris déficientes en interleukine-10 colonisées avec une souche sauvage d'*E. faecalis* productrice d' $O_2^{\cdot-}$ développent à la fois une inflammation et un cancer colorectal (CRC pour *colorectal cancer*), tandis que celles qui l'ont été avec un mutant non producteur d' $O_2^{\cdot-}$ n'aboutissent qu'à une inflammation. Ainsi, la formation de tumeurs chez ces souris dépend de la production de $O_2^{\cdot-}$ extracellulaire (Wang *et al.*, 2012). Ces données soulignent l'importance des commensaux intestinaux en général, et des entérocoques en particulier, dans le développement de CRC (Sinicrope, 2007).

III.2. Les activités antioxydantes d'*E. faecalis*

Le stress oxydatif est l'un des principaux défis auquel les bactéries doivent faire face au cours de leur processus infectieux. Les phagocytes, qui constituent la première ligne de défense de l'organisme, internalisent et détruisent les pathogènes, notamment par la production de ROS (Nathan, 1983). Pour faire face à ces derniers, les bactéries nécessitent une défense antioxydante puissante et *E. faecalis* a largement fait preuve de l'efficacité de ses capacités dans ce domaine. A titre d'exemple, pour atteindre une mortalité de 99,8% de cellules d'*E. faecalis* en phase exponentielle de croissance, il faut procéder à un traitement de 30 minutes avec de l' H_2O_2 à une concentration de 45 mM. Les concentrations élevées d' H_2O_2 soulignent la forte résistance au stress oxydatif d'*E. faecalis* (Flahaut *et al.*, 1998). Cette étonnante capacité de résistance résulte de l'expression d'un important arsenal d'enzymes de détoxification qui sont énumérées dans le tableau 3.

Tableau 3. Protéines jouant (ou susceptibles de jouer) un rôle dans la réponse au stress oxydatif et leur présence chez *E. faecalis*. Adapté de Riboulet *et al.*, 2007.

Protein	Gene	<i>E. faecalis</i> gene ^a	Enzymatic reactions or regulated genes	Reference
<i>Protective enzymes</i>				
Superoxide dismutase	<i>sodA</i>	EF0463	$2H^+ + 2O_2^- \rightarrow H_2O_2 + O_2$	Poyart <i>et al.</i> [2000]
Catalase	<i>kata</i>	EF1597	$2 H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$	Frankenberg <i>et al.</i> [2002]
Glutathione reductase	<i>gor</i>	EF3270	$NADPH + H^+ + GS-SG \rightarrow NADP^+ + 2 GSH$	Paulsen <i>et al.</i> [2003]
NADH peroxidase	<i>npr</i>	EF1211	$NADH + H^+ + H_2O_2 \rightarrow NAD^+ + 2H_2O$	Ross and Claiborne [1991]
NADH oxidase	<i>nox</i>	EF1586	$2NADH + O_2 + 2H^+ \rightarrow 2NAD^+ + 2H_2O$ (NADH:H ₂ O oxidase) $NADH + O_2 + H^+ \rightarrow NAD^+ + H_2O_2$ (NADH:H ₂ O ₂ oxidase)	Paulsen <i>et al.</i> [2003]
Alkyl peroxide reductase	<i>ahpC</i>	EF2739	$ROOH + AhpC(SH)_2 \rightarrow ROH + AhpC(S-S) + H_2O$	Verneuil <i>et al.</i> [2004]
Peroxiredoxine reductase	<i>ahpF</i>	EF2738	$AhpC(S-S) + AhpF(SH)_2 \rightarrow AhpC(SH)_2 + AhpF(S-S)$ $AhpF(S-S) + NAD(P)H + H^+ \rightarrow AhpF(SH)_2 + NAD(P)^+$	Verneuil <i>et al.</i> [2004]
Thioredoxine reductase	<i>trx</i>	EF1338; EF1405	$Trx(S-S) + NAD(P)H + H^+ \rightarrow Trx(SH)_2 + NAD(P)^+$	Paulsen <i>et al.</i> [2003]
Organic hydroperoxide resistance protein	<i>ohr</i>	EF0453	$ROOH + Ohr(SH)_2 \rightarrow ROH + Ohr(S-S) + H_2O$	Rincé <i>et al.</i> [2005]
DNA-binding protein	<i>dps</i>	EF3233; EF0606 ^b	Bind and protect DNA from the oxidative stress	Paulsen <i>et al.</i> [2003]
Peptide methionine-S- sulfoxide reductase	<i>msrA</i>	EF1681	$Met-(S)-SO \rightarrow Met$	Paulsen <i>et al.</i> [2003]
Peptide methionine-R-sulfoxide reductase	<i>msrB</i>	EF3164	$Met-(R)-SO \rightarrow Met$	Laplace <i>et al.</i> [2000]

Ainsi, *E. faecalis* est capable de synthétiser une superoxyde dismutase (SodA – Poyart *et al.*, 2000 ; Verneuil *et al.*, 2006), les trois peroxydases alkyl hydroperoxyde réductase (AhpCF), NADH peroxydase (Npr) et thiol peroxydase (Tpx) (La Carbona *et al.*, 2007) ainsi que la protéine Gsp65 (pour *general stress protein*), homologue à la protéine Ohr (pour *organic hydroperoxide resistance*) de *Bacillus subtilis* impliquée dans la réponse au stress oxydatif (Rincé *et al.*, 2001). De plus, le génome d'*E. faecalis* code plusieurs autres enzymes conservées

qui participent à la détoxification des ROS, comprenant la glutathion réductase (Gor), la NADH oxydase (Nox) et le complexe thiorédoxine (TrxA–TrxB) (Bourgogne *et al.*, 2008 ; Paulsen *et al.*, 2003). Une activité catalase (KatA) peut être détectée à partir de cellules cultivées en milieu aérobie et supplémenté en hème. Cependant, cette activité est très faible et peut être réellement mise en évidence uniquement lorsque le gène *katA* est cloné et exprimé dans un vecteur à grand nombre de copies (Frankenberg *et al.*, 2002).

III.3. Relation entre le stress oxydatif et la tolérance aux antibiotiques chez les entérocoques

Une grande majorité des isolats cliniques d'entérocoques sont intrinsèquement tolérants à de nombreux antibiotiques bactéricides, y compris aux β -lactamines et aux glycopeptides (Krogstad et Pargwette, 1980). Ces souches échappent à leur activité bactéricide, et ce même à des doses plusieurs fois supérieures à leur concentration minimale inhibitrice (CMI). Des mécanismes qui confèrent une protection contre ces antibiotiques ont récemment fait l'objet de recherches chez les entérocoques (Bizzini *et al.*, 2009 ; Ladjouzi *et al.*, 2013, 2015). Dans ce contexte, des mutants déficients dans un ou plusieurs gènes codant des activités de défense contre le stress oxydatif ont été construits et testés pour évaluer leur contribution à la tolérance d'*E. faecalis* JH2–2 aux antibiotiques. Parmi ces mutants, seul celui déficient dans son activité SodA révèle une sensibilité à la vancomycine, à la pénicilline et dans une moindre mesure, à la norfloxacine, utilisées à des doses équivalentes à 20 fois leur CMI (Bizzini *et al.*, 2009). Cette dépendance de la tolérance à ces deux inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne à l'égard de l'activité SodA a été confirmée pour une autre souche d'*E. faecalis* et même pour une autre espèce d'entérocoques, en l'occurrence *E. faecium* (Ladjouzi *et al.*, 2013). De leurs résultats, Bizzini *et al.* (2009) ont proposé que l'exposition à des antibiotiques bactéricides induit la production d' $O_2^{\cdot-}$ chez *E. faecalis* (Figure 8). Chez une souche sauvage, l' $O_2^{\cdot-}$ est détoxifié en H_2O_2 par SodA, puis en eau et O_2 par l'action des peroxydases et de la catalase, conduisant à un phénotype de tolérance. L' H_2O_2 semble moins délétère, car des mutants déficients dans des gènes codant des peroxydases et/ou catalase demeurent tolérants à ces antibiotiques. Par contre, chez le mutant *sodA*, l' $O_2^{\cdot-}$ s'accumule jusqu'à atteindre des niveaux toxiques qui endommagent des cibles cellulaires sensibles, causant la mort bactérienne (Figure 8 – Bizzini *et al.*, 2009).

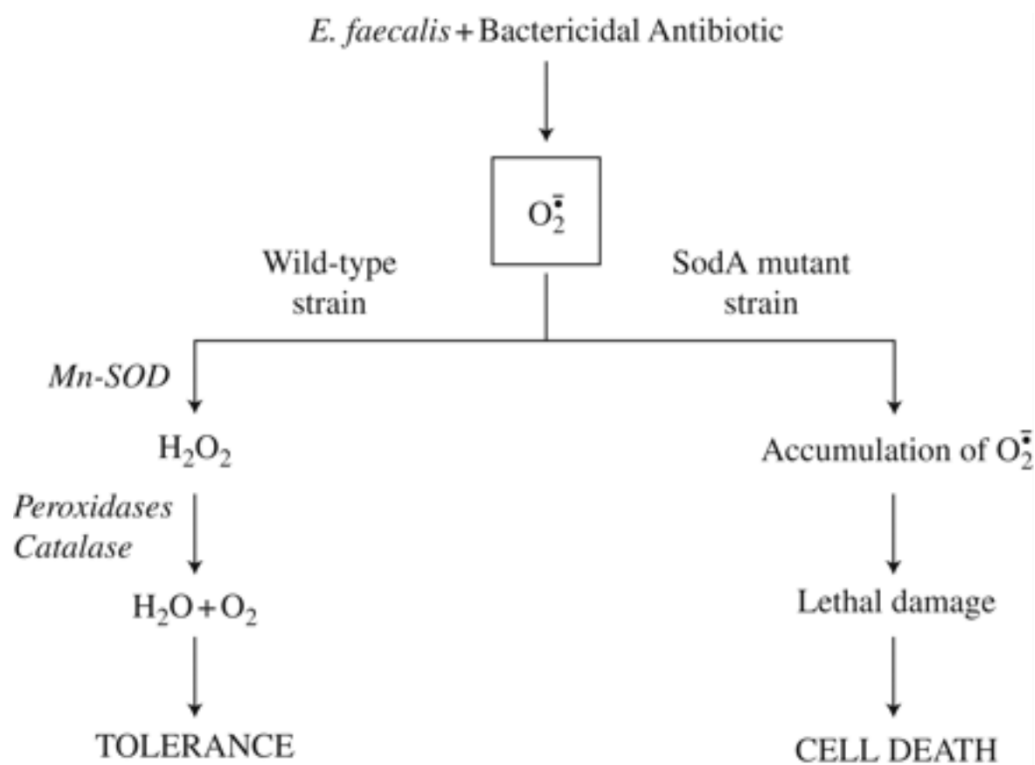


Figure 8. Modèle proposé pour l'action des antibiotiques bactéricides chez *E. faecalis*. Par un mécanisme encore inconnu, l'exposition aux antibiotiques bactéricides induit la production d' $O_2^{\cdot-}$. Dans une souche de type sauvage, l' $O_2^{\cdot-}$ est détoxifié de façon continue, d'abord en H_2O_2 par SodA, puis en eau et O_2 par l'action des peroxydases et de la catalase, conduisant à un phénotype de tolérance. En revanche, chez le mutant isogénique *sodA*, l' $O_2^{\cdot-}$ s'accumule à des niveaux toxiques et réagit avec des cibles sensibles, menant finalement à la mort cellulaire. D'après Bizzini *et al.*, 2009.

Les mécanismes par lesquels ces antibiotiques favorisent la production d' $O_2^{\cdot-}$ intracellulaire restent à déterminer. Enfin, *E. faecalis* peut générer de l' $O_2^{\cdot-}$ extracellulaire via une DMK associée à la membrane (Huycke *et al.*, 2001). Cependant, ce site de production d' $O_2^{\cdot-}$ ne semble pas jouer de rôle dans l'activité de la vancomycine, puisque l'inactivation du gène *menB* correspondant ne protège pas le mutant *sodA* contre cet antibiotique (Bizzini *et al.*, 2009).

Chapitre IV. Objectifs du travail de thèse

La thématique de l'équipe Stress et Virulence de l'Unité de Recherche Risques Microbiens de l'Université de Caen Normandie porte sur l'étude des interactions entre des bactéries gram-positives et leur environnement. Celle-ci inclut la caractérisation des réponses développées par ces micro-organismes suite aux variations physico-chimiques de leur milieu. Un axe majeur de cette thématique concerne l'étude de l'antibiorésistance des entérocoques.

C'est dans cette optique que nous avons orienté ce travail sur la compréhension de l'action des antibiotiques β -lactamines chez *Enterococcus faecalis*, une bactérie pathogène opportuniste, aéro-anaérobie facultative. Avec l'objectif de rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques pour lutter contre les infections à entérocoques, différentes études ont été menées au sein de notre équipe. Ces dernières ont permis de démontrer le rôle essentiel d'une enzyme de détoxification, la superoxyde dismutase dans la tolérance des entérocoques à la vancomycine et à la pénicilline, utilisés à des doses équivalentes à 20 fois leur concentration minimale inhibitrice (Bizzini *et al.*, 2009 ; Ladjouzi *et al.*, 2013, 2015). Ces études ont également permis de proposer un modèle selon lequel ces antibiotiques induisent un stress oxydatif en provoquant la formation de superoxyde intracellulaire (voir figure 8 ; Bizzini *et al.*, 2009). Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse consiste à déterminer si d'autres antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne sont capables d'induire un stress oxydatif chez des entérocoques d'intérêt clinique et dans l'affirmative, par quel type de mécanisme.

Pour mener à bien ce travail, la recherche de l'induction d'un stress oxydatif par l'amoxicilline et la céfotaxime sera entreprise chez la souche d'*E. faecalis* JH2-2, le modèle d'étude de notre équipe. Les stratégies envisagées peuvent être exposées en deux points. Tout d'abord, la sensibilité à ces antibiotiques chez des mutants déficients dans un ou plusieurs gènes codant des activités antioxydantes sera analysée par des approches physiologiques. Ensuite, des techniques de biochimie seront employées pour la détection d'espèces réactives de l'oxygène au cours du traitement antibiotique, essentiellement le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

Chapitre I. Souches bactériennes et plasmides

Les souches bactériennes utilisées lors de cette étude sont listées dans le tableau 4.

Tableau 4. Souches bactériennes utilisées dans cette étude.

Souches bactériennes	Caractéristiques	Références
<i>E. faecalis</i>		
JH2–2	Fus ^R Rif ^R dépourvue de plasmide	Jacob et Hobbs, 1974
$\Delta sodA$	JH2–2 $\Delta sodA$. Mutant du gène <i>sodA</i>	Verneuil <i>et al.</i> , 2006
<i>menB</i>	JH2–2 <i>menB</i> :: <i>pVE14218</i> . Mutant du gène <i>menB</i>	Cette étude
$\Delta sodA menB$	JH2–2 $\Delta sodA menB$:: <i>pVE14218</i> . Mutant des gènes <i>sodA</i> et <i>menB</i>	Bizzini <i>et al.</i> , 2009
$\Delta npr\Delta tpx\Delta ahpCF$	JH2–2 $\Delta npr\Delta tpx\Delta ahpCF$. Mutant des gènes <i>npr</i> , <i>tpx</i> et <i>ahpCF</i>	La Carbona <i>et al.</i> , 2007
<i>E. faecium</i>		
AUS0004	Isolat clinique, type sauvage	Lam <i>et al.</i> , 2012
$\Delta sodA$	AUS0004 $\Delta sodA$. Mutant du gène <i>sodA</i>	Cette étude
Δgpx	AUS0004 Δgpx . Mutant du gène <i>gpx</i>	Cette étude
<i>E. coli</i>		
VE14188	<i>dam</i> [–] <i>dcm</i> [–] RepA ⁺ . Hôte du vecteur <i>pVE14218</i>	Rigottier–Gois <i>et al.</i> , 2011
EC1000	Hôte du vecteur <i>pWS3</i>	Leenhouts <i>et al.</i> , 1996

La souche d'*E. faecalis* JH2–2 est issue de l'isolat clinique JH2 suite à l'action d'un mutagène chimique, le *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitroso-guanidine. Celle-ci, résistante à l'acide fusidique et à la rifampicine, est dépourvue de plasmide (Jacob et Hobbs, 1974). La souche d'*E. faecium* AUS0004 est un isolat clinique résistant à la vancomycine (Lam *et al.*, 2012). Les caractéristiques des mutants construits à partir des souches d'*E. faecalis* JH2–2 et d'*E. faecium* AUS0004 sont mentionnées dans le tableau 4. Les souches d'*E. coli* VE14188 et EC1000 (Tableau 4) sont utilisées comme cellules réceptrices pour le clonage des fragments ADN servant à la mutagenèse.

Les caractéristiques des plasmides utilisés lors de cette étude sont indiquées dans le tableau 5.

Tableau 5. Plasmides utilisés dans cette étude.

Plasmides	Caractéristiques	Références
pVE14218– <i>menB</i>	Tet ^R . Vecteur pVE14218 à réplication conditionnelle, contenant un fragment interne du gène <i>menB</i> utilisé pour la mutagenèse d' <i>E. faecalis</i>	Bizzini <i>et al.</i> , 2009
pGhost3	Chl ^R RepA ^{TS} . Plasmide « helper » à réplication thermosensible permettant la réplication du vecteur pVE14218– <i>menB</i>	Maguin <i>et al.</i> , 1992
pWS3	Spt ^R . Plasmide à réplication thermosensible utilisé pour la mutagenèse d' <i>E. faecium</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2011
pWS3– <i>sodA</i>	Vecteur pWS3 contenant les régions en amont et en aval du gène <i>sodA</i>	Cette étude
pWS3– <i>gpx</i>	Vecteur pWS3 contenant les régions en amont et en aval du gène <i>gpx</i>	Cette étude

Chapitre II. Techniques d'analyses physiologiques

II.1. Milieux de culture

E. coli est cultivée en milieu LB (Tableau 6 – Miller, 1972) et les souches d'entérocoques *E. faecalis* et *E. faecium* sont cultivées en milieu liquide M17 (Terzaghi et Sandine, 1975) dans lequel le lactose est remplacé par du glucose 0,3 % (GM17 – Tableau 7). Pour le milieu gélifié, 15 g/L d'agar sont additionnés aux milieux décrits ci-dessus. Quand nécessaire, la tétracycline et le chloramphénicol sont utilisés à 10 µg/ml.

Tableau 6. Composition du milieu LB.

Ingrédients	Quantités
Peptone de caséine-viande	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Eau déminéralisée	qsp 1 litre
pH ajusté à 7,1	

Tableau 7. Composition du milieu GM17.

Composé	Quantités
Peptone universelle	5 g
Peptone de farine de soja	5 g
Extrait de levure	2,5 g
Extrait de viande	5 g
Glucose	3 g
Acide ascorbique	0,5 g
β -Glycérophosphate de sodium	19 g
MgSO ₄ , H ₂ O	0,25 g
Eau déminéralisée	qsp 1 litre

II.2. Détermination des survies

Une colonie isolée est ensemencée dans 10 ml de GM17, supplémenté en tétracycline si nécessaire, et cultivée à 37°C pendant environ 16 h (culture de nuit).

Pour la survie en condition aérobie, la culture est diluée dans 100 ml de GM17 en erlenmeyer de 1000 ml afin d'obtenir une DO_{600nm} finale de 0,01 puis incubée à 37°C sous agitation à 60 tr/min pendant environ 3 h jusqu'à une DO_{600nm} de 0,5 (phase exponentielle de croissance). Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation (10 min à 4500 tr/min, température ambiante) et remises en suspension dans du GM17 préchauffé à 37°C de manière à ajuster la DO_{600nm} à 0,5. Huit millilitres de culture sont alors répartis dans autant d'erlenmeyers (capacité de 100 ml) que nécessaire. A ce stade, 2 ml d'antibiotique [dilué en GM17 afin d'obtenir la concentration finale désirée d'amoxicilline ou de céfotaxime (Panpharma, Luitré, France)] sont ajoutés à chaque culture et 2 ml de GM17 dans la culture « témoin ». Des prélèvements sont effectués immédiatement (T₀) puis après différents temps (8 h, 16 h et 24 h) d'incubation à 37°C sous agitation à 60 tr/min. Ces derniers sont ensuite dilués (cascade de dilution de 10 en 10) en solution saline (0,9% NaCl), ensemencés sur milieu GM17 gélosé, puis incubés à 37°C pendant 48 h. La survie est estimée par numération des

colonies. Seules les boîtes présentant un nombre de colonies compris entre 30 et 300 sont prises en compte.

Pour la survie en condition semi-anaérobie, une culture de nuit est diluée dans 100 ml de GM17 dans une bouteille fermée d'une capacité de 100 ml afin d'obtenir une DO_{600nm} finale de 0,01 puis incubée à 37°C sans agitation pendant environ 3 h jusqu'à une DO_{600nm} de 0,5. L'expérience de survie est effectuée comme précédemment à la différence qu'elle est réalisée dans des tubes fermés de 10 ml et que ceux-ci ne sont pas agités.

Lorsqu'ils sont utilisés, la catalase, le fumarate, l'hématine ou la déféroxamine (Sigma–Aldrich, Saint–Louis, Missouri, Etats–Unis) sont dilués en GM17 avec les antibiotiques afin d'obtenir des concentrations finales respectives de 500 U/ml, 8 mM, 8 μ M ou 100 μ M. Une solution mère d'hématine à 20 mM est préparée dans du NaOH (1,4%). Quand nécessaire, la catalase est inactivée 5 min à 100°C.

II.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Les CMI sont déterminées par la méthode de microdilution approuvée par le NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standards – Andrews, 2001).

Chapitre III. Techniques de biochimie

III.1. Dosage de l' H_2O_2

Les cellules traitées avec des antibiotiques comme décrit dans la section II.2 sont prélevées à T_0 et après les différents temps d'incubation, puis centrifugées (10 min à 4500 tr/min, 4°C). Les surnageants sont ensuite collectés pour déterminer leur concentration en H_2O_2 à l'aide du kit « Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay » (Invitrogen, Carlsbad, Californie, Etats–Unis) comme décrit précédemment (Bizzini *et al.*, 2009).

Brièvement, les échantillons sont dilués 100 fois dans du tampon phosphate salin (50 mM, pH 7,4) puis les concentrations d'H₂O₂ sont déterminées à partir de 50 µl de ces dilutions et 50 µl d'une solution contenant 50 µM du réactif Amplex[®] Red et 0,1 U/ml de peroxydase de raifort (HRP pour *horseradish peroxidase*). En parallèle, une gamme de dilution d'H₂O₂ allant de 0 à 20 µM est préparée avec du GM17 dilué 100 fois dans le tampon phosphate salin et traité comme décrit ci-dessus pour les échantillons. Les réactions sont ensuite incubées pendant 30 min à température ambiante. La fluorescence a été mesurée avec un lecteur FlexStation 3 (Molecular Devices, San José, Californie, États-Unis) en utilisant une longueur d'onde d'excitation et de détection de 530 et 590 nm respectivement. Le bruit de fond, déterminé pour une réaction de contrôle ne contenant pas d'H₂O₂, est soustrait à chaque valeur.

III.2. Dosage de l'O₂^{•-} extracellulaire

Les cellules traitées avec des antibiotiques comme décrit dans la section II.2 sont collectées après 24 h d'incubation par centrifugation (4500 tr/min pendant 10 min), lavées deux fois avec une solution tampon (7,5 mM de sulfate d'ammonium, 6 mM de chlorure de sodium, 33 mM de potassium dihydrophosphate, 60 mM d'hydrophosphate de potassium et 1 mM de magnésium, pH 7,3), et remises en suspension dans cette même solution à une DO_{550nm} approximative de 0,2. La production de O₂^{•-} extracellulaire est mesurée comme décrit par Huycke *et al.* (1996) avec de légères modifications. Brièvement, après avoir été maintenu à température ambiante, du ferricytochrome *c* est ajouté à la suspension cellulaire dans des cuvettes de 1 cm pour obtenir une concentration finale de 20 µM, et sa réduction est suivie à 550 nm pendant 10 min en présence ou en absence de SOD (25 µg/ml – Sigma–Aldrich, Saint–Louis, Missouri, États–Unis) à l'aide d'un spectrophotomètre SmartSpec™Plus (BioRad, Hercules, Californie, États–Unis). Le taux de réduction du ferricytochrome *c* est calculé par régression linéaire. Le taux de réduction en absence de SOD est corrigé par soustraction du taux mesuré en sa présence. La production d'O₂^{•-} est calculée comme décrit par Huycke *et al.* (1996), en utilisant un coefficient d'extinction de 21,5 mM⁻¹ cm⁻¹ pour le cytochrome *c* réduit. Le nombre d'UFC/ml est déterminé de manière à reporter le taux de production d'O₂^{•-} en nmol/min/10⁹ UFC.

Chapitre IV. Techniques de biologie moléculaire

IV.1. Construction du mutant *menB* chez la souche d'*E. faecalis* JH2–2

La construction du mutant *menB* chez la souche d'*E. faecalis* JH2–2 est réalisée par mutagenèse insertionnelle ciblée grâce au vecteur pVE14218 contenant un fragment interne du gène *menB* précédemment utilisé pour construire le double mutant *sodA menB* (Tableau 5 – Bizzini *et al.*, 2009). L'intégration chromosomique du vecteur recombinant pVE14218–*menB* est basée sur un système utilisant un autre plasmide « helper », le vecteur pGhost3 (Chl^R, RepA^{TS}) qui permet la répllication conditionnelle du vecteur pVE14218–*menB* (Tet^R). Après transformation par électroporation du plasmide recombinant dans la souche d'*E. faecalis* JH2–2 portant le vecteur pGhost3 (voir section IV.6), les transformants sont sélectionnés sur milieu GM17 en présence de chloramphénicol et de tétracycline à 28°C pour permettre aux plasmides de se répliquer. La présence du vecteur pVE14218–*menB* est vérifiée par réactions de polymérisation en chaîne (PCR pour *polymerase chain reaction*) avec le couple d'oligonucléotides oef102 et oef106. L'intégration du vecteur pVE14218–*menB* dans le chromosome est obtenue en cultivant en milieu liquide en présence de tétracycline les transformants d'abord à 28°C pendant 2 heures, puis à 42°C (température non permissive) pour occasionner la perte du plasmide helper et forcer l'intégration du vecteur recombinant pVE14218–*menB* par recombinaison homologue au niveau du locus *menB*. Les transformants sont ensuite isolés sur milieu solide GM17 en présence de tétracycline à 42°C pendant 24 à 48 heures et vérifiés par PCR en utilisant le couple d'oligonucléotides TX4000_*menB*_1 et 2 (voir section IV.4).

IV.2. Mutagenèse dirigée par double recombinaison homologue chez *E. faecium*

La mutagenèse est réalisée par double recombinaison homologue à l'aide du vecteur pWS3. Deux fragments d'une taille moyenne de 1 kb correspondant aux régions en amont et en aval du gène à déléter sont amplifiés indépendamment par PCR (voir section IV.4). Les couples d'oligonucléotides sont conçus de façon à ce que l'extrémité 3' de l'amplicon correspondant à

la région en amont soit associée à l'extrémité 5' de celui correspondant à la région en aval du gène cible sans créer de décalage de phase de lecture. Les deux fragments d'ADN sont purifiés et servent de matrice pour une deuxième amplification par une PCR dite « chevauchante » engendrant un fragment d'une taille moyenne de 2 kb correspondant seulement aux régions amont et aval du gène à déléter. L'amplicon est ensuite purifié et cloné dans le vecteur pWS3, lequel est transformé dans la souche d'*E. coli* EC1000 par électroporation (voir section IV.5 et 6). Les bactéries transformées sont sélectionnées sur un milieu gélosé contenant de la spectinomycine (100 µg/ml).

Après vérification par PCR et séquençage des clones portant le plasmide « mutateur », ce dernier est extrait et transformé par électroporation dans la souche d'*E. faecium* AUS0004 (voir section IV.6). Les transformants sont sélectionnés sur milieu GM17 en présence de spectinomycine (500 µg/ml) à 30°C pour permettre au plasmide recombinant de se répliquer. L'intégration du plasmide par recombinaison homologue est obtenue en cultivant les transformants à 37°C (température non permissive) en milieu liquide puis isolés sur milieu gélosé en présence de l'antibiotique. Après avoir vérifié par PCR le premier évènement de recombinaison, les bactéries sont à nouveau cultivées à la température permissive de 30°C sans pression de sélection afin de favoriser l'excision du plasmide. Cette dernière peut s'effectuer par un second évènement de recombinaison entre les mêmes séquences ayant servi à l'intégration, ou entre les séquences homologues de la seconde région, permettant dans cette dernière hypothèse la création du mutant souhaité. Les colonies ayant perdu le plasmide sont analysées par PCR pour mettre en évidence la délétion. Enfin, une étape de séquençage permet de contrôler le mutant obtenu (voir section IV.7).

IV.3. Extractions des acides nucléiques

L'ADN chromosomique de la souche d'*E. faecium* AUS0004 est extrait à l'aide du kit « NucleoSpin® Microbial DNA » (Macherey–Nagel, Düren, Allemagne). Le degré de pureté de l'ADN est estimé par la mesure de la DO à 260 nm (maximum d'absorption de l'ADN) rapportée à celle mesurée à 280 nm (maximum d'absorption des protéines). Ce rapport doit être supérieur ou égal à 1,8 et inférieur à 2 (Sambrook *et al.*, 1989). La concentration d'ADN est alors évaluée, une DO de 1 à 260 nm correspondant à 50 µg d'ADN par ml.

L'ADN plasmidique d'*E. coli* est extrait à l'aide du kit « NucleoSpin® Plasmid » (Macherey–Nagel, Düren, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur.

IV.4. Réactions de polymérisation en chaîne

Les séquences des oligonucléotides et leur utilisation sont listées dans le tableau 8. Pour l'exemple, la nomenclature des oligonucléotides utilisés pour la construction de mutant de délétion du gène *sodA* de la souche d'*E. faecium* AUS0004 sera décrite. Les paires d'oligonucléotides notés Aus0004_sodA_1–2 et Aus0004_sodA_3–4 ont été utilisés pour l'amplification des régions en amont et en aval du gène *sodA* à déléter, respectivement. Pour la deuxième PCR, dite « chevauchante », les oligonucléotides notés Aus0004_sodA_5 et 6 ont été utilisés. Pour vérifier les constructions et les événements de recombinaison, les oligonucléotides notés pWS3_1 et 2, complémentaires de séquences bordant le site multiple de clonage du vecteur pWS3 ont été utilisés.

Tableau 8. Séquences des oligonucléotides utilisés dans cette étude.

Oligonucléotides	Séquence (5'–3')
TX4000_menB_1	CTCTAAAGTGCCGATTCTTGTG
TX4000_menB_2	GATCGAAATCTGGTGTCCGT
oef102	GGCGATCGGACTAAACAATTG
oef106	TGATGAAACGGCACGGATAG
Aus0004_sodA_1	CCTACACAGCCACAGAGATC
Aus0004_sodA_2	GAAATGGTTACATAAAAAAATTCCTCCTCAATGTTTTTC
Aus0004_sodA_3	GGAATTTTTTTTATGTAACCATTTCTCCGTCATATCAG
Aus0004_sodA_4	CGTCCTTGTTCCGTTCTTCC
Aus0004_sodA_5	CGCGGGTACCGCATTCAAGCGGTTCCTTC (KpnI)
Aus0004_sodA_6	CGCGCTCGAGGGCTCGCTTCTCCCATAAATC (XhoI)
Aus0004_gpx_1	GGACACAGCGATGTAGTAGC
Aus0004_gpx_2	TATTAAGTTACATAAAGTTTTCTCCTTTCTATTTTATATA
Aus0004_gpx_3	AAACTTTATGTAACCTTAATAAAAAATAAAAAAAGATGAACT
Aus0004_gpx_4	CGATCAGCCGCAGTGAATA
Aus0004_gpx_5	CGCGGGTACCGGTTACTTCAGCGCGGAATC (KpnI)
Aus0004_gpx_6	CGCGCTCGAGGTACAGGATAGGTAGGAGCCG (XhoI)
pWS3_1	TTTCCCAGTCACGACGTTGT
pWS3_2	ACTGACAGCTTCCAAGGAGC

Les réactions de PCR sont réalisées avec l'ADN Polymérase Phusion (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) pour la construction des plasmides

« mutateurs » et GoTaq[®] (Promega, Madison, Wisconsin, États-Unis) pour la vérification de ces constructions et des événements de recombinaison, selon le protocole des fournisseurs. Ces réactions sont effectuées dans un thermocycleur Mastercycler Personal (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) en utilisant 10 à 100 ng d'ADN matrice et 0,5 µM de chacune des amorces. Les températures d'hybridation des amorces sont calculées selon les instructions recueillies auprès des fournisseurs accessibles sur les sites <http://www.thermofisher.com/tmcalculator> et <http://www.promega.com/biomath>. Les temps d'élongation sont adaptés à la taille des fragments à amplifier et à l'enzyme utilisée. Les produits PCR obtenus sont purifiés en utilisant le kit « NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up » (Macherey–Nagel, Düren, Allemagne) selon les instructions du fabricant.

Pour les PCR à partir de colonies, l'ADN matrice est remplacé par 1 µl d'un lysat cellulaire obtenu après chauffage 10 sec à 800 watts au micro-ondes d'une colonie dans 50 µl d'eau ultra pure.

IV.5. Restrictions et ligatures de l'ADN

Les endonucléases de restriction sont fournies par Promega (Madison, Wisconsin, États-Unis) et sont employées selon les recommandations du fournisseur. Les produits PCR et les plasmides digérés sont purifiés en utilisant le kit « NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up » (Macherey–Nagel, Düren, Allemagne) selon les instructions du fabricant. Les ligatures sont effectuées en employant la T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis) avec 1 µg/ml de vecteur et cinq fois plus de fragments à insérer. La réaction est incubée 10 min à 22°C.

IV.6. Transformation d'*E. coli* et des entérocoques par électroporation

Les bactéries électrocompétentes d'*E. coli* sont préparées selon la méthode décrite par Dower *et al.* (1988). Brièvement, 100 ml de LB sont inoculés avec 2 ml d'une culture de nuit puis incubés à 37°C sous agitation (120 tr/min). Les cellules en phase exponentielle de croissance (DO_{600nm} ~0,6–0,7) sont récoltées par centrifugation (4500 tr/min à 4°C pendant

10 min). Elles sont ensuite lavées avec 100 ml d'eau ultra pure stérile froide puis recentrifugées. Ce cycle est répété pour des volumes de lavage de 50 ml d'eau ultra pure froide, puis 25 ml et 10 ml de glycérol 10%. Les cellules sont enfin remises en suspension dans 500 µl de cette même solution. Les bactéries sont alors réparties dans des tubes par fraction de 50 µl avant d'être soit transformées, soit conservées à -80°C pour une électroporation ultérieure.

Pour les entérocoques, la préparation des cellules électrocompétentes est réalisée de la manière suivante. Cent millilitres de GM17 sont inoculés avec 2 ml d'une culture de nuit puis incubés à 37°C . Les cellules en phase exponentielle de croissance ($\text{DO}_{600\text{nm}} \sim 0,5$) sont mises sur glace pendant 15 min. Elles sont ensuite récoltées par centrifugation (4500 tr/min à 4°C pendant 10 min) puis remises en suspension dans 1 ml de glycérol 10%. Les cellules sont alors récoltées par centrifugation (12500 tr/min à 4°C pendant 90 sec) et reprises par 500 µl d'une solution de traitement aux muramidases (saccharose 20%, EDTA 10 mM, NaCl 50 mM, Tris 10 mM, pH 8,0) à laquelle est ajoutée extemporanément du lysozyme et de la mutanolysine aux concentrations finales respectives de 10 µg/ml et 10 U/ml. Elles sont ensuite incubées 37°C pendant 15 min avant d'être récoltées par centrifugation (12500 tr/min pendant 90 sec) et lavées 4 fois par 1 ml de tampon d'électroporation (saccharose 0,5 M, glycérol 10%, pH 7) puis remises en suspension dans 500 µl de cette même solution. Les bactéries sont alors réparties dans des tubes par fraction de 100 µl avant d'être soit transformées, soit stockées à -80°C pour une électroporation ultérieure.

La transformation est réalisée à l'aide d'un appareil Gene Pulser (BioRad, Hercules, Californie, Etats-Unis). Pour ce faire, 1 µl de la solution d'ADN est mélangé à une fraction aliquote de cellules électrocompétentes. Le mélange est maintenu moins de 5 min sur glace, déposé dans une cuvette d'électroporation de 0,2 cm refroidit au préalable avant de réaliser le choc électrique. Celui-ci est effectué sous une tension de 2,5 kV et une capacitance de 25 µF, la résistance est ajustée respectivement à 200 ou 400 Ω pour *E. coli* ou les entérocoques.

Immédiatement après le choc électrique, les cellules d'*E. coli* sont reprises dans 1 ml de milieu LB puis mises en culture pendant 40 min à 37°C . Les cellules d'entérocoques sont reprises dans 1 ml de milieu GM17 supplémentée en saccharose 0,5 M, MgCl_2 20 mM, CaCl_2 2 mM, puis incubées 1 heure et 30 min à 37°C . Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur les milieux gélosés appropriés supplémentés en antibiotique(s).

IV.7. Séquençage de l'ADN

Les réactions de séquençage sont effectuées en suivant une méthode dérivée de celle décrite par Sanger *et al.* (1992). L'analyse des fragments synthétisés est effectuée à l'aide d'un séquenceur automatique ABI 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, Californie, Etats-Unis) par la société Eurofins MWG Operon (Ebersberg bei München, Allemagne).

Résultats et discussion

Résultats et discussion

Chapitre I. Résumé de la publication

L'argument selon lequel les antibiotiques bactéricides stimulent la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *reactive oxygen species*) chez certaines bactéries en augmentant leur activité respiratoire est sujet à discussions. *Enterococcus faecalis* a des propriétés intéressantes pour tester cette hypothèse. La respiration ne s'observe qu'en présence d'hème ou de fumarate. En l'absence d'hème, *E. faecalis* produit du superoxyde extracellulaire par l'autoxydation d'une demethylmenaquinone (DMK), un composant de sa chaîne respiratoire associé à sa membrane. En raison de cette propriété, *E. faecalis* est soupçonné de jouer un rôle dans la cancérogenèse colorectale. Nous montrons dans cette étude que les β -lactamines amplifient significativement la production de ROS. Cette augmentation, dépendante de DMK, n'est observée qu'en l'absence de respiration. Nos résultats pourraient également fournir une explication quant au risque accru de cancer colorectal observé chez des patients traités par des β -lactamines, comme le montrent de récentes études cliniques.

Chapitre II. Publication

β -Lactams Might Increase the Risk of Cancer by Boosting ROS Formation in *Enterococcus faecalis*. Loïc Léger, Aurélie Budin-Verneuil, Margherita Cacaci, Abdellah Benachour, Axel Hartke, Nicolas Verneuil.

Article en préparation.

β–Lactams Might Increase the Risk of Cancer by Boosting ROS Formation in *Enterococcus faecalis*

Loïc Léger,¹ Aurélie Budin–Verneuil,¹ Margherita Cacaci,² Abdellah Benachour,¹ Axel
Hartke,^{1*} Nicolas Verneuil¹

¹Normandie Univ, UNICAEN, U2RM – Unité de Recherche Risques Microbiens, Caen, France.

²Università Cattolica del Sacro Cuore, Istituto di Microbiologia, Roma, Italia.

*Corresponding author: Tel: (+33) 231 565 404; E–mail: axel.hartke@unicaen.fr

1 **Abstract**

2 The proposal that bactericidal antibiotics stimulate the formation of reactive oxygen species
3 (ROS) by increasing respiration is still a matter of debate. *Enterococcus faecalis* has interesting
4 properties to test this hypothesis. Respiration occurs only in the presence of heme or fumarate.
5 In the absence of heme, *E. faecalis* produces extracellular superoxide through autoxidation of
6 demethylmenaquinone (DMK), a component of its respiratory chain. Due to this ability,
7 *E. faecalis* is suspected to play a role in colorectal carcinogenesis. We show in this study that
8 β -lactam antibiotics increase significantly the production of ROS. This boost of ROS formation
9 is DMK-dependent and only observed in the absence of respiration. Our results could provide
10 a mechanistic explanation for the observed increased risk of colorectal cancer by β -lactam
11 antibiotics in several recent nested case-control studies.

1 **Main Body of the Publication**

2 *Enterococcus faecalis*, a gram-positive facultative aerobic/anaerobic bacterium, is a usual
3 member of the intestinal microbiome of humans. However, it is a rather worrying commensal
4 since it has been identified as an important health care-associated pathogen (1). Furthermore,
5 it is suspected to play a role in colorectal carcinogenesis due to its ability to produce
6 extracellular superoxide ($O_2^{\cdot-}$) through autoxidation of membrane-associated
7 demethylmenaquinone (DMK) (2).

8 Compared to other gram-positive cocci, enterococci exhibit decreased susceptibility to
9 penicillins and high-level resistance to cephalosporins. These β -lactams are bactericidal
10 antibiotics that inhibit cell wall synthesis by binding to extracellular enzymes, known as
11 penicillin-binding proteins (PBPs) that catalyze cross-linking of peptidoglycan peptide side
12 chains. The intrinsic resistance of enterococci to these β -lactams is the result of expression of
13 low-affinity PBPs, but the exact molecular mechanism seems to be more complex (3).

14 Still a matter of debate is how bactericidal antibiotics kill bacteria. Induction of an
15 oxidative stress by these drugs has been proposed to be part of the killing mechanism. The
16 oxidative stress-based killing model suggests that bactericidal antibiotics, including β -lactams,
17 not only inhibit their primary targets but also elicit by yet unknown mechanisms alterations in
18 central metabolism and an acceleration of respiration. This would lead to an increase of the
19 release of reactive oxygen species (ROS) from the respiratory chain overwhelming the cellular
20 antioxidant defences and leading finally to cell death (see (4) for a recent review). Other studies
21 with *Escherichia coli* persuasively argued that under the tested conditions antibiotics did not
22 induce respiration and ROS formation and that killing by the drugs was independent from
23 oxidative stress (5–7).

1 These controversial viewpoints reflect that our mechanistic understanding of the action
2 of bactericidal antibiotics on bacteria remains incomplete. The main hurdle to unambiguously
3 demonstrate if bactericidal antibiotics causatively trigger oxidative stress is the lack of direct
4 methods to measure production rates of ROS by living wild-type bacteria in the presence of the
5 drugs. In this report we will present convincing experimental results that β -lactam antibiotics
6 are conditionally capable to significantly increase ROS formation in *E. faecalis*.

7 We concentrated our efforts first on amoxicillin which is still the treatment of choice for
8 enterococcal infections that lack mechanisms for high-level resistance. We wondered whether
9 this bactericidal drug induces an oxidative stress in the clinical isolate *E. faecalis* JH2-2. Since
10 wild-type cells of this species are highly resistant to oxidants, we used a mutant defective in
11 manganese-cofactored superoxide dismutase (MnSOD or SodA), which is hypersensitive to
12 ROS, as an indicator (8). In the absence of the drug, survival of the *sodA* mutant decreased
13 slightly between 16 hours and 24 hours of incubation under the used aeration condition
14 (fig. S1A). This is likely due to the generation and accumulation of ROS since no decrease in
15 survival is observed with resting cultures (fig. S1A). Treatment of the *sodA* mutant with
16 amoxicillin under aerobic and anaerobic conditions showed that survival was comparable to
17 that of the parental strain under both conditions until 16 hours of incubation (Fig. 1A and
18 fig. S1B). However, the mutant strain is $\sim 5.7 \log_{10}$ more susceptible to this treatment at
19 24 hours under aerobic *versus* anaerobic conditions (Fig. 1A). We concluded that these results
20 are in agreement with a ROS-based killing mode of the MnSOD deficient *E. faecalis* mutant
21 under these experimental conditions. Killing starts after 16 hours of aerobic amoxicillin
22 treatment suggesting that endogenous $O_2^{\cdot-}$ creates some sort of damage that happens to be
23 exploited by amoxicillin or that ROS are formed continuously during incubation and
24 accumulate finally to concentrations which became lethal for the *sodA* mutant.

1 The main ROS generated in living cells are $O_2^{\cdot-}$, hydrogen peroxide (H_2O_2) and
2 hydroxyl radicals. This last species is highly unstable and immediately react with surrounding
3 biomolecules. So, only $O_2^{\cdot-}$ and/or H_2O_2 might accumulate in amoxicillin-treated aerobic
4 cultures. If accumulation of H_2O_2 is responsible for killing, then addition of catalase which
5 catalyses the dismutation of H_2O_2 to molecular oxygen and water should protect the cells from
6 amoxicillin action. As shown in Fig. 1B, killing of the *sodA* mutant by the drug was nearly
7 entirely suppressed in the presence of catalase, strongly suggesting that H_2O_2 accumulated
8 during amoxicillin treatment and causatively contributes to antibiotic-mediated killing. In the
9 next step, we verified this hypothesis by directly quantifying H_2O_2 production by *E. faecalis* in
10 the presence and absence of amoxicillin using Amplex Red/horseradish peroxidase assay. In
11 the absence of the antibiotic, the *sodA* mutant generated H_2O_2 which reached a maximum
12 concentration of around 700 μ M after 16 hours of incubation and was slightly lower at 24 hours
13 (Fig. 1C). In contrast, in the presence of amoxicillin, cells produced H_2O_2 continuously over
14 the whole incubation time to reach >2000 μ M after 24 hours that is around 4-times more than
15 in the absence of the drug (Fig. 1C). We wondered then if amoxicillin treatment will also induce
16 an increased H_2O_2 production in wild-type cells. Growth and survival during the 24 hours
17 incubation of *E. faecalis* JH2-2 under aerobic and anaerobic conditions are similar (fig. S1C)
18 and the amoxicillin concentration of 0.25 μ g/ml used in the experiments was bacteriostatic for
19 this strain (fig. S1B). Relative to the *sodA* mutant, the H_2O_2 concentrations measured were
20 globally lower but we found that also in the parental strain the β -lactam treatment triggered an
21 increased continuous accumulation of H_2O_2 over the 24 hours incubation period (Fig. 1, C and
22 D). After 24 hours, the H_2O_2 concentration accumulated was >600 μ M in the presence of the
23 drug which correspond to 8.4-fold more of this ROS than in the absence of the antibiotic
24 (Fig. 1D). Collectively, the data are in agreement with the proposal that cell wall-targeting

antibiotics have additional effects on bacterial physiology than the sole inhibition of their primary targets. A consequence of these secondary effects is the increased generation of ROS.

Next, we addressed the question about the molecular mechanism(s) of drug-induced ROS formation. The cell death pathway model proposed the involvement of the respiratory chain as the primary source of increased intracellular ROS formation by antibiotics (9). *E. faecalis* is capable of aerobic respiration and the presence of cytochromes and DMK has been identified in its membrane (10). However, since enterococci lack the ability to synthesize heme, their cytochromes are only functional in the presence of a source for this prosthetic group. In the absence of heme, respiration is blocked, and it has been demonstrated that this leads to an increase in extracellular $O_2^{\cdot-}$ generation through autoxidation of membrane-associated DMK (10). Since a known H_2O_2 -producing pathway in *E. faecalis* is the spontaneous disproportionation of extracellular $O_2^{\cdot-}$ (11), we wondered whether the antibiotic-induced ROS formation could be a result of the stimulation of autoxidation of DMK. To test this possibility, we measured survival of a *sodA menB* double mutant in the presence of amoxicillin. The *menB* gene encodes 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid synthase catalysing an essential step in the DMK biosynthesis pathway. Relative to the *sodA* single mutant, the *sodA menB* double mutant was $>4 \log_{10}$ less killed by the β -lactam antibiotic (Fig. 2A), likely due to reduced ROS production. This was confirmed by measuring H_2O_2 concentrations in the culture medium of the *menB* single and the *sodA menB* double mutants. H_2O_2 concentration in the former strain was under the detection limit and the latter strain accumulated 6 times and 3 times less H_2O_2 than the *sodA* single mutant at 16 hours and 24 hours, respectively (Fig. 2B). This strongly suggested DMK as the source of H_2O_2 accumulation. If right, depletion of electrons from the reduced DMK pool should also decrease killing by amoxicillin. This was tested by addition of heme which induces synthesis of cytochrome *bd* oxidase allowing aerobic respiration as well as by addition of fumarate which allows anaerobic respiration (10). In both cases, killing of the

sodA mutant (Fig. 2, C and D) and accumulation of H₂O₂ were significantly reduced (Fig. 2, E and F).

At least two mechanisms could explain an increased accumulation of ROS in the presence of antibiotics in the wild-type strain. It could be due to an increased input of electrons into the respiratory chain which increases the pool of reduced menaquinones or to a defect in H₂O₂ decomposition. In the case of the latter hypothesis, a mutant affected in H₂O₂ detoxification should accumulate H₂O₂ at the same level in the absence as in the presence of amoxicillin. The main peroxide defence of *E. faecalis* is based on three peroxidases, the NADH peroxidase, the alkyl hydroperoxide reductase and the thiol peroxidase which have been characterized previously (12). The analysis of H₂O₂ accumulation of the triple peroxidase mutant constructed in the aforementioned study revealed that this strain accumulated 5.7 times more H₂O₂ in the presence than in the absence of the antibiotic (fig. S2). Thus, the amoxicillin seems not to influence the H₂O₂ defence mechanisms of *E. faecalis*. On the other hand, an accelerated introduction of electrons into the respiratory chain should increase O₂^{•-} formation which can be measured using the ability of O₂^{•-} to reduce ferricytochrome *c*. This showed that at 24 hours incubation amoxicillin-treated cells produced >2-fold more O₂^{•-} than untreated cells when normalized to CFU counts (Fig. 2G). However, no differences between untreated and treated cultures were obtained when normalized to OD_{550nm}. We cannot exclude that the non-growing cells in the antibiotic-treated cultures are still metabolically active and contribute in ROS formation. Nevertheless, the results are in agreement that amoxicillin stimulates ROS production by a DMK-dependant mechanism, but only in the absence of respiration.

E. faecalis is suspected to play a role in colorectal carcinogenesis. This pro-carcinogenic potential seems to be linked with its capacity to generate O₂^{•-} by the autoxidation of DMK since tumour formation was observed with wild-type bacteria but not with *menB* mutants (2). The results presented in this communication might therefore reveal an important

1 concern on the careful use of β -lactam antibiotics since these drugs increase significantly the
2 generation of ROS in *E. faecalis* which could increase the risk of colorectal cancer (CRC)
3 development. Interestingly, several recent nested case-control studies analysing large
4 population-based databases demonstrated indeed a higher risk for CRC with increased number
5 of antibiotic courses and exposure intensities, especially with the most frequently prescribed
6 penicillins (13, 14). Our results might indicate that *E. faecalis* could be a prime candidate to
7 provide a mechanistic explanation for the increased incidence of CRC after therapy with β -
8 lactams. This risk might be even amplified in patients treated with broad-spectrum
9 cephalosporins, since enterococci exhibit intrinsic resistance to these antibiotics, enabling them
10 to proliferate and achieve abnormally high densities in the gastrointestinal tract under these
11 conditions (15). We wondered therefore whether cephalosporins would also stimulate the
12 generation of ROS. As shown in Fig. 3, this is indeed the case. The *sodA* mutant was $\sim 6.1 \log_{10}$
13 more susceptible than the parental strain to treatment with 1 $\mu\text{g/ml}$ cefotaxime, a third-
14 generation cephalosporin (Fig. 3A). The antibiotic promoted H_2O_2 accumulation in both strains
15 (Fig. 3, B and C) and at the 24 hours time point, cefotaxime-treated wild-type cells showed
16 that relative to untreated cells, extracellular $\text{O}_2^{\cdot-}$ production was stimulated ~ 1.8 -fold when
17 normalized to CFU counts (Fig. 3D).

18 Apart from providing a potential mechanistic explanation for the increased risk of CRC
19 development after antibiotic treatment, the present study contributes also to an ongoing
20 discussion concerning the secondary mode of actions of antibiotics (7). Our results clearly
21 demonstrate that β -lactams increase the production of ROS in *E. faecalis* and hence are, in this
22 aspect, in agreement with the previously reported cell death pathway model of Kohanski and
23 collaborators (9). Interestingly, this phenomenon is independent on susceptibility of the
24 bacterium to the antibiotic since both amoxicillin for which the used *E. faecalis* strain is
25 susceptible and cefotaxime for which it is resistant elicit this response. However, in contrast to

1 the cell death pathway model, significant ROS production is only observed when the respiratory
2 chain is not operating due to non-functional cytochromes. The molecular mechanism how β -
3 lactams increase ROS accumulation in *E. faecalis* is still uncertain. Our results might indicate
4 that β -lactams increase by as yet unknown mechanisms the introduction of electrons into the
5 respiratory chain. In the absence of heme (and hence cytochromes) or fumarate, the pool of
6 reduced DMK increases which consequently stimulate the formation of $O_2^{\cdot-}$. In the presence of
7 heme or fumarate, electrons will not accumulate in the DMK pool but are transferred to the
8 terminal cytochrome *bd* oxidase which reduces oxygen to water.

1 **Figure Legends**

2 **Fig. 1.** Amoxicillin treatment correlates with H₂O₂ production (and accumulation). (A) *sodA*
3 mutant was incubated with 0.25 µg/ml amoxicillin under both semi-anaerobic (open diamonds)
4 and aerobic (solid diamonds) conditions, and survival was monitored over time. (B) *sodA*
5 mutant was incubated with 0.25 µg/ml amoxicillin and 500 U/ml catalase (CAT; solid
6 diamonds) or heat-inactivated catalase (H-I CAT; open diamonds) under aerobic conditions,
7 and at designated time points viable counts were determined. (C and D) *sodA* mutant (C) and
8 wild-type cells (D) were treated (grey bars) or not (open bars) with 0.25 µg/ml amoxicillin
9 under aerobic conditions, and at designated time points supernatants of cultures were collected
10 to determine the H₂O₂ concentration. These figure data are reported as the means and standard
11 deviations from at least three independent experiments.

12 **Fig. 2.** Amoxicillin increases the production of extracellular O₂^{•-}. (A) *sodA* (open diamonds)
13 and *sodA menB::tet* (open triangles) mutants were treated with 0.25 µg/ml amoxicillin under
14 aerobic conditions, and at designated time points viable counts were determined. (B) *sodA*
15 (open bars), *menB::tet* (grey bars) and *sodA menB::tet* mutants (closed bars) were treated with
16 0.25 µg/ml amoxicillin under aerobic conditions, and at designated time points supernatants of
17 cultures were collected to determine the H₂O₂ concentration. (C and D) *sodA* mutant was treated
18 with 0.25 µg/ml amoxicillin under aerobic conditions, and at designated time points viable
19 counts were determined. In (C), cells were treated in the presence of 8 µM haematin/0.04%
20 NaOH (HEM; solid diamonds) or 0.04% NaOH (NaOH; open diamonds) and in (D), in the
21 presence (+FUM; solid diamonds) or absence (-FUM; open diamonds) of 8 mM fumarate. (E
22 and F) *sodA* mutant was treated with 0.25 µg/ml amoxicillin under aerobic conditions, and at
23 designated time points supernatants of cultures were collected to determine the H₂O₂

1 concentration. In (E), cells were treated in the presence of 8 μ M haematin/0.04% NaOH (HEM;
2 grey bars) or 0.04% NaOH (NaOH; open bars) and in (F), in the presence (+FUM; grey bars)
3 or absence (–FUM; open bars) of 8 mM fumarate. (G) Wild–type cells were treated (grey bar)
4 or not (open bar) with 0.25 μ g/ml amoxicillin under aerobic conditions for 24 hours, after which
5 samples were collected to determine the ongoing rate of extracellular $O_2^{\cdot-}$ production. All data
6 are reported as the means and standard deviations from at least three independent experiments.

7 **Fig. 3.** Cefotaxime stimulates the production of extracellular $O_2^{\cdot-}$. (A) Wild–type (open
8 squares) and *sodA* mutant (open diamonds) cells were treated with 1 μ g/ml cefotaxime under
9 aerobic conditions, and at designated time points viable counts were determined. (B and C)
10 *sodA* mutant (B) and wild–type cells (C) were treated (grey bars) or not (open bars) with
11 1 μ g/ml cefotaxime under aerobic conditions, and at designated time points supernatants of
12 cultures were collected to determine the H_2O_2 concentration. (D) Wild–type cells were treated
13 (grey bar) or not (open bar) with 1 μ g/ml cefotaxime under aerobic conditions for 24 hours,
14 after which samples were collected to determine the ongoing rate of extracellular $O_2^{\cdot-}$
15 production. These figure data are reported as the means and standard deviations from at least
16 three independent experiments.

Fig. 1.

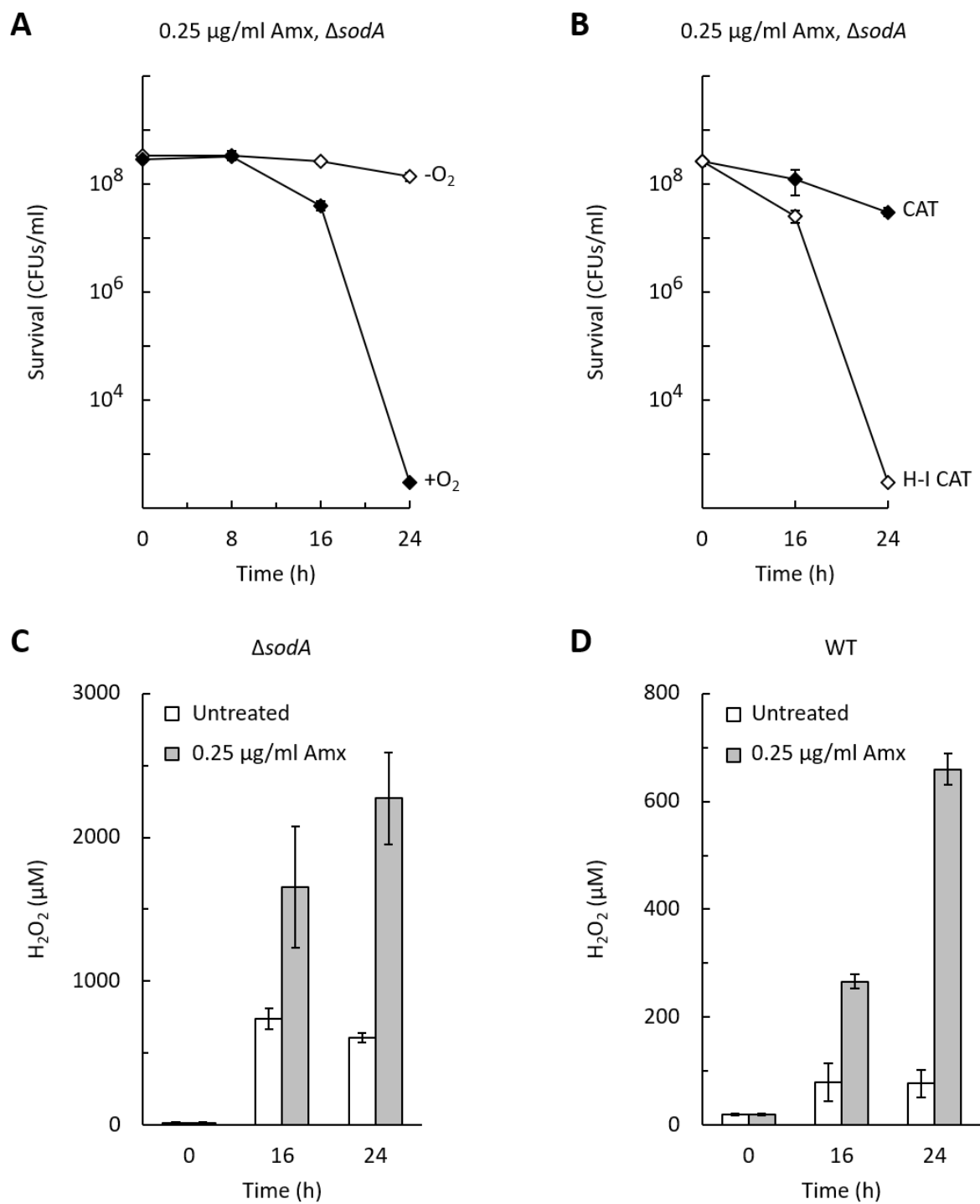


Fig. 2.

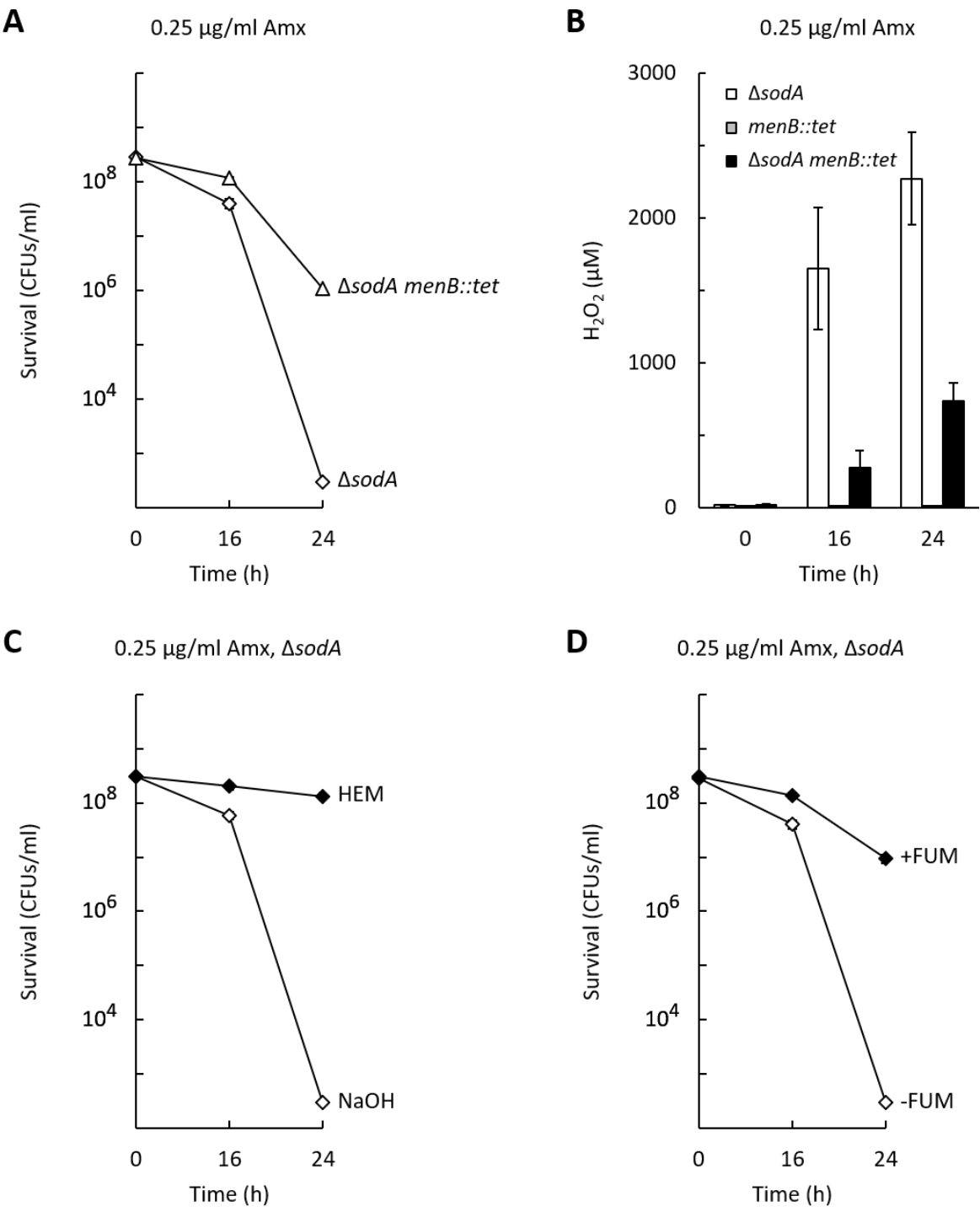


Fig. 2.

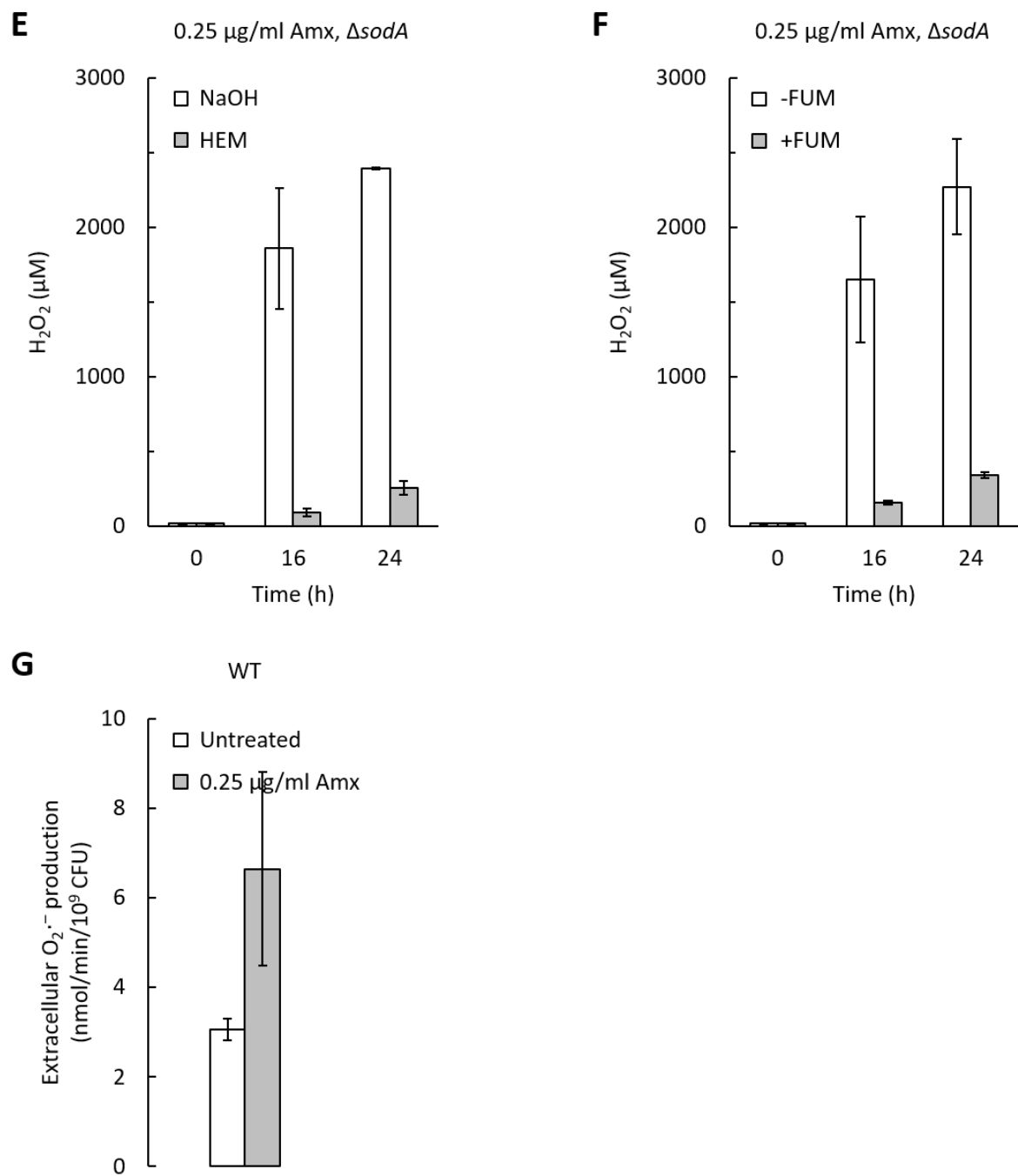
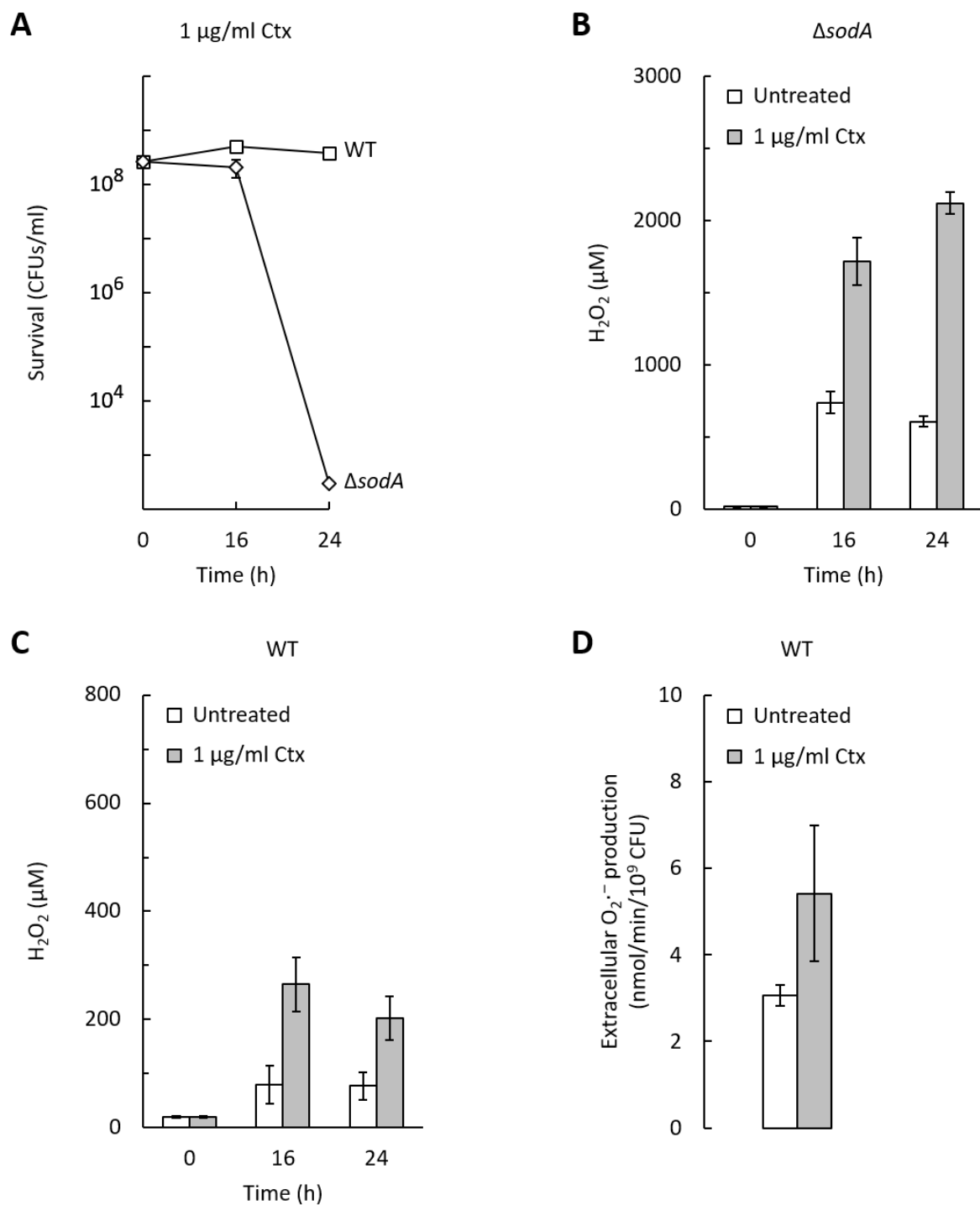


Fig. 3.



References

1. M. S. Gilmore, F. Lebreton, W. van Schaik, Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**, 10–16 (2013).
2. X. Wang *et al.*, 4-hydroxy-2-nonenal mediates genotoxicity and bystander effects caused by *Enterococcus faecalis*-infected macrophages. *Gastroenterology*. **142**, 543–551 (2012).
3. C. J. Kristich, L. B. Rice, C. A. Arias, “Enterococcal Infection–Treatment and Antibiotic Resistance” in *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, M. S. Gilmore, D. B. Clewell, Y. Ike, N. Shankar, Eds. (Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, 2014).
4. D. J. Dwyer, J. J. Collins, G. C. Walker, Unraveling the physiological complexities of antibiotic lethality. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **55**, 313–332 (2015).
5. B. Ezraty *et al.*, Fe–S cluster biosynthesis controls uptake of aminoglycosides in a ROS-less death pathway. *Science*. **340**, 1583–1587 (2013).
6. I. Keren, Y. Wu, J. Inocencio, L. R. Mulcahy, K. Lewis, Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science*. **339**, 1213–1216 (2013).
7. Y. Liu, J. A. Imlay, Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science*. **339**, 1210–1213 (2013).
8. N. Verneuil *et al.*, Implication of (Mn)superoxide dismutase of *Enterococcus faecalis* in oxidative stress responses and survival inside macrophages. *Microbiol.* **152**, 2579–2589 (2006).

9. M. A. Kohanski, D. J. Dwyer, B. Hayete, C. A. Lawrence, J. J. Collins, A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*. **130**, 797–810 (2007).
10. M. M. Huycke *et al.*, Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* requires demethylmenaquinone and is attenuated by functional terminal quinol oxidases. *Mol. Microbiol.* **42**, 729–740 (2001).
11. M. M. Huycke, V. Abrams, D. R. Moore, *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis*. **23**, 529–536 (2002).
12. S. La Carbona *et al.*, Comparative study of the physiological roles of three peroxidases (NADH peroxidase, Alkyl hydroperoxide reductase and Thiol peroxidase) in oxidative stress response, survival inside macrophages and virulence of *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* **66**, 1148–1163 (2007).
13. Y. Cao *et al.*, Long-term use of antibiotics and risk of colorectal adenoma. *Gut* (2017).
14. V. K. Dik, M. G. H. van Oijen, H. M. Smeets, P. D. Siersema, Frequent Use of Antibiotics Is Associated with Colorectal Cancer Risk: Results of a Nested Case–Control Study. *Dig. Dis. Sci.* **61**, 255–264 (2016).
15. C. J. Donskey, J. A. Hanrahan, R. A. Hutton, L. B. Rice, Effect of parenteral antibiotic administration on the establishment of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in the mouse gastrointestinal tract. *J. Infect. Dis.* **181**, 1830–1833 (2000).

Supplementary Materials for

β–Lactams Might Increase the Risk of Cancer by Boosting ROS

Formation in *Enterococcus faecalis*

Loïc Léger,¹ Aurélie Budin–Verneuil,¹ Margherita Cacaci,² Abdellah Benachour,¹ Axel
Hartke,^{1*} Nicolas Verneuil¹

¹Normandie Univ, UNICAEN, Unité de Recherche Risques Microbiens, 14000 Caen, France.

²Università Cattolica del Sacro Cuore, Istituto di Microbiologia, Roma Italia.

*Corresponding author: Tel: (+33) 231 565 404; E–mail: axel.hartke@unicaen.fr

1 **Materials and Methods**

2 **Bacterial Strains and Growth Medium**

3 The bacterial strains used in this study are listed in Table S1. Strains of *E. faecalis* were grown
4 in M17 medium (16) supplemented with 0.3% glucose (GM17) (Table S2). *E. coli* VE14188
5 was cultivated at 37°C in Luria–Bertani (LB) broth (17) with agitation or on LB agar. When
6 appropriate, tetracycline (10 µg/ml for *E. faecalis*, 12.5 µg/ml for *E. coli*) was added to the
7 medium.

8 **Survival**

9 For overnight cultures, a single colony was grown at 37°C in 10 ml of GM17, with tetracycline
10 if necessary, for about 16 hours. For survival in aerobic conditions, the culture was diluted in
11 100 ml of GM17 in a 1000 ml Erlenmeyer flask to obtain a final OD_{600nm} of 0.01. The bacterial
12 suspension was incubated at 37°C with moderate shaking (60 rpm) for about 3 hours until
13 reaching OD_{600nm} of 0.5 (exponential growth phase). Cells were then collected by centrifugation
14 (10 minutes at 3,000 *g*) and resuspended in fresh GM17 prewarmed at 37°C. Eight millilitres
15 of culture were then distributed into 100 ml Erlenmeyer flasks and 2 ml of antibiotics [diluted
16 in GM17 to obtain a final concentration of 0.25 µg/ml or 1 µg/ml amoxicillin or cefotaxime
17 (Panpharma, France), respectively] were added. In the case of the controls without antibiotic,
18 2 ml of GM17 were added to these flasks. Samples were collected immediately (T₀) and after
19 incubation for 8 h, 16 h and 24 h at 37°C with shaking at 60 rpm. All samples were then serially
20 diluted in 0.9% saline, spread onto GM17 plates, and incubated at 37°C for about 48 hours.
21 Survival was determined by counting colonies on plates that had between 30 and 300 colonies.

For survival in semi-anaerobic conditions, an overnight culture (~16 hours) was diluted in 100 ml of GM17 in a 100 ml-sealed bottle to obtain a final OD_{600nm} of 0.01 and incubated at 37°C without agitation for about 3 hours until OD_{600nm} of 0.5. The survival experiments were carried out as previously described except that it was performed in 10 ml sealed tubes without agitation.

When used, catalase, fumarate, or haematin (Sigma-Aldrich, MO) were diluted to a final concentration of 500 U/ml, 8 mM and 8 µM, respectively. Haematin was prepared as a 20 mM stock solution in 1,4 mM NaOH. Catalase was inactivated by boiling for 5 min.

Hydrogen Peroxide Assay

Cells treated with antibiotics as described above, were collected at T₀ and after the different incubation times and centrifuged (10 min at 3,000 g). The concentrations of H₂O₂ were measured in the supernatants using Amplex[®] Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Invitrogen, OR) as described previously (18). Fluorescence was measured with a FlexStation 3 reader (Molecular Devices, CA).

Extracellular Superoxide Assay

Cells treated with antibiotics as described above were collected after 24 hours by centrifugation (10 min at 3,000 g), washed twice with Washing Buffer (7.5 mM ammonium sulfate, 6 mM sodium chloride, 33 mM potassium dihydrophosphate, 60 mM potassium hydrophosphate, and 1 mM magnesium, pH 7.3), and resuspended in Washing Buffer supplemented with 0.33% glucose to an approximate OD_{550nm} of 0.2. The extracellular O₂^{•-} production was measured as described by Huycke *et al.* (19) with slight modifications. Briefly, after being warmed to room temperature, ferricytochrome *c* was added to cell suspension in 1 cm-cuvettes to obtain a final

concentration of 20 μ M, and the reduction of ferricytochrome *c* was monitored over 10 min at 550 nm in the presence or absence of SOD (25 μ g/ml; Sigma–Aldrich, MO) in a SmartSpecTMPlus spectrophotometer (Biorad, CA). The rate of ferricytochrome *c* reduction was calculated using linear regression. The rate of reduction in the absence of SOD was corrected from the rate measured in its absence. $O_2^{\cdot-}$ production was calculated as described by Huycke *et al.* (19), using an extinction coefficient of 21.5 $mM^{-1} cm^{-1}$ for reduced cytochrome *c*. In contrast to (19), viable counts were determined to report the rate of superoxide production in nmol/min/ 10^9 CFU.

DNA Manipulations, Antibiotics, Chemicals and Enzymes

All DNA manipulations were performed using standard techniques (20). Antibiotics, chemicals, and enzymes were reagent–grade, commercially available products.

Construction of *menB* Mutant

To construct the *menB* mutant, we used the recombinant pVE14218 (a pORI derivative plasmid) harbouring an internal fragment of *menB* gene (*menB*::*pVE14218*) previously used to construct the Δ *sodA menB* double mutant (18). The *menB* mutant was obtained following a single crossing over insertion–duplication mutagenesis based on a two–vector system using the plasmids pGhost3, which provides functional RepA^{Ts}, and the conditionally replicating pVE14218 (Tet^R).

1 **Figure Legends**

2 **Fig. S1.** (A) *sodA* mutant was incubated in absence of antibiotic under both semi-anaerobic
3 (open diamonds) and aerobic (solid diamonds) conditions, and survival was monitored over
4 time. (B and C) Wild-type cells were incubated in presence (B) or absence (C) of 0.25 µg/ml
5 amoxicillin under both semi-anaerobic (open squares) and aerobic (solid squares) conditions,
6 and survival was monitored over time. Results are reported as the means and standard
7 deviations from at least three independent experiments.

8 **Fig. S2.** *npr tpx ahpCF* mutant was treated (grey bars) or not (open bars) with 0.25 µg/ml
9 amoxicillin under aerobic conditions, and at designated time points supernatants of cultures
10 were collected to determine the H₂O₂ concentration. Results are reported as the means and
11 standard deviations from at least three independent experiments.

Fig. S1.

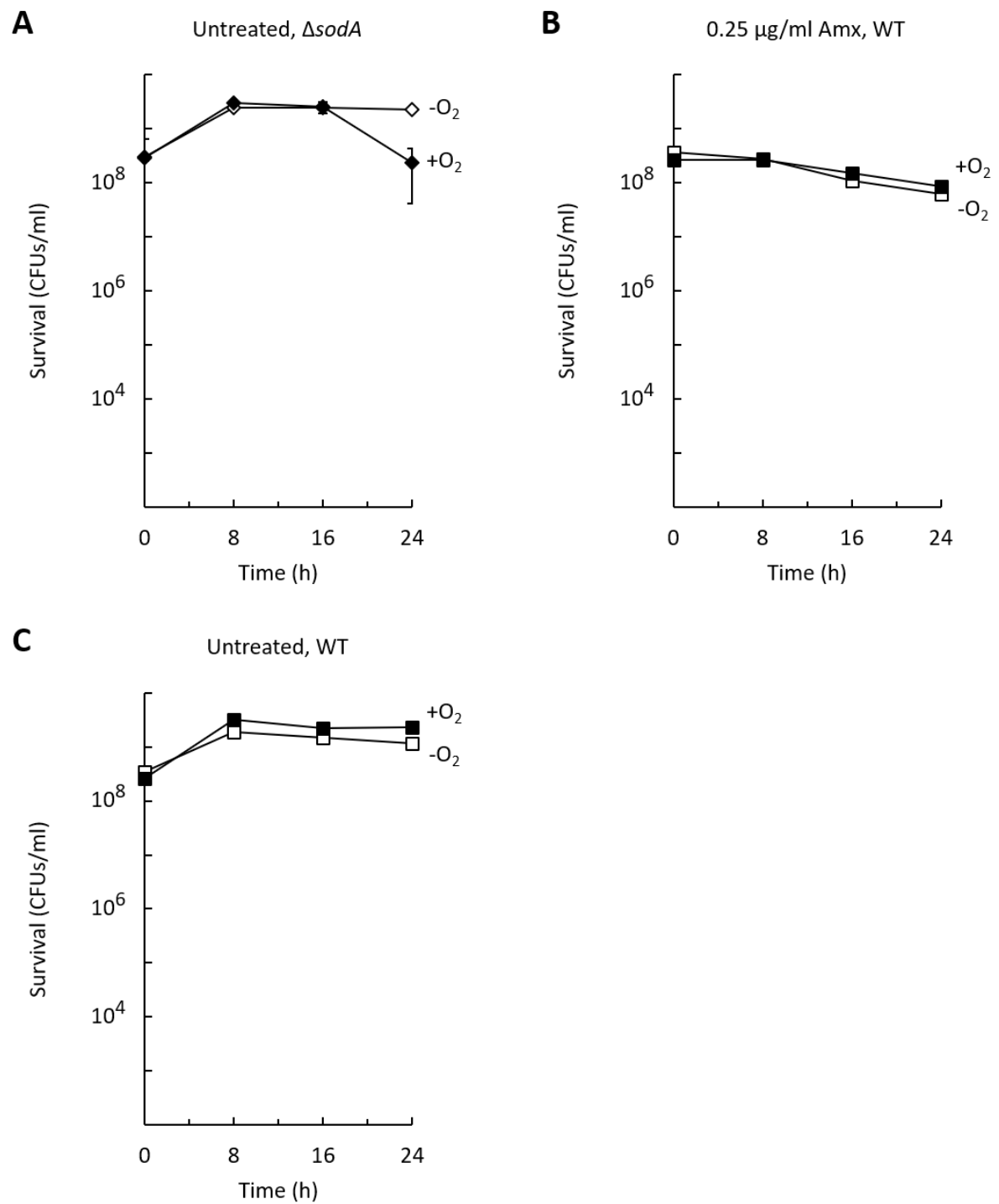


Fig. S2.

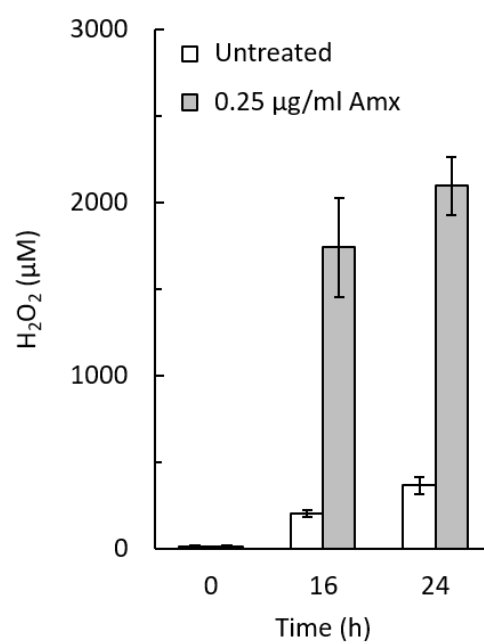


Table S1. Bacterial strains used in this study.

Bacterial strains	Characteristics	References
<i>E. faecalis</i>		
JH2-2	Fus ^R Rif ^R plasmid-free	(21)
Δ sodA	JH2-2 Δ sodA	(8)
<i>menB::tet</i>	JH2-2 <i>menB::pVE14218</i> , Tet ^R	This work
Δ sodA <i>menB::tet</i>	JH2-2 Δ sodA <i>menB::pVE14218</i> , Tet ^R	(18)
Δ npr Δ tpx Δ ahpCF	JH2-2 Δ npr Δ tpx Δ ahpCF	(12)
<i>E. coli</i>		
VE14188	dam ⁻ dcm ⁻ RepA ⁺	(22)

Table S2. Composition of GM17 medium.

Compounds	Quantities
Peptone	5 g
Soytone	5 g
Yeast extract	2.5 g
Meat extract	5 g
Glucose	3 g
Ascorbic acid	0.5 g
β-glycerophosphate, sodium salt	19 g
MgSO ₄ , H ₂ O	0.25 g
Distilled water	adjusted to 1 liter

References

16. B. E. Terzaghi, W. E. Sandine, Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* **29**, 807–813 (1975).
17. J. H. Miller, *Experiments in Molecular Genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1972).
18. A. Bizzini, C. Zhao, Y. Auffray, A. Hartke, The *Enterococcus faecalis* superoxide dismutase is essential for its tolerance to vancomycin and penicillin. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**, 1196–1202 (2009).
19. M. M. Huycke, W. Joyce, M. F. Wack, Augmented production of extracellular superoxide by blood isolates of *Enterococcus faecalis*. *J. Infect. Dis.* **173**, 743–746 (1996).
20. J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989).
21. A. E. Jacob, S. J. Hobbs, Conjugal transfer of plasmid–borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J. Bacteriol.* **117**, 360–372 (1974).
22. L. Rigottier–Gois *et al.*, Large–scale screening of a targeted *Enterococcus faecalis* mutant library identifies envelope fitness factors. *PLoS One.* **6**, e29023 (2011).

Chapitre III. Résultats complémentaires et discussion

Dans le contexte de recherche de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de lutter contre les infections bactériennes, la relation entre le stress oxydatif et l'action antibiotique a été largement étudiée, principalement chez le modèle d'étude *E. coli*, mais également chez d'autres bactéries. Néanmoins, nous ne disposons que de peu d'informations concernant les entérocoques. Différentes études menées au sein de notre équipe ont révélé une sensibilité à la vancomycine et à la pénicilline d'entérocoques déficients dans leur activité SOD. Par contre, les souches sauvages sont tolérantes à ces antibiotiques et par conséquent, échappent normalement à leur activité bactéricide, et ce même lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations 20 fois supérieures à leur CMI. Ces études ont permis de proposer un modèle selon lequel ces antibiotiques induisent un stress oxydatif en provoquant la formation de $O_2^{\cdot-}$ intracellulaire (voir figure 8 – Bizzini *et al.*, 2009 ; Ladjouzi *et al.*, 2013, 2015). L'induction de la formation de ROS par les antibiotiques est en accord avec le modèle proposé par Kohanski *et al.* (2007). Cependant, la contribution du stress oxydatif à l'activité bactéricide des antibiotiques chez des cellules sauvages d'*E. faecalis* n'a pas été démontrée. Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail de thèse a été de déterminer si un stress oxydatif peut être induit et contribuer à l'action d'un autre antibiotique pour lequel *E. faecalis* n'est pas tolérant, l'amoxicilline. Ce dernier est également un inhibiteur de la paroi bactérienne et reste le traitement de choix pour les infections dues à des souches d'*E. faecalis* qui ne présentent pas de résistance de haut niveau. Dans ce chapitre, nous discuterons de la contribution des ROS et d'autres acteurs moléculaires dans l'activité antibactérienne de l'amoxicilline et de la céfotaxime, ainsi que de résultats préliminaires concernant l'autre espèce d'entérocoques ayant un intérêt clinique majeur, *E. faecium*.

III.1. Contribution des hydrolases du peptidoglycane dans l'activité bactériolytique de l'amoxicilline

Les hydrolases du peptidoglycane, ou autolysines, regroupent de nombreuses enzymes capables de cliver des liaisons du peptidoglycane. Elles participent à la synthèse de la paroi bactérienne, sa régulation ainsi qu'à différents phénomènes de lyse (Shockman *et al.*, 1996).

Par ailleurs, ces enzymes jouent un rôle dans l'activité bactériolytique des antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne chez *Streptococcus pneumoniae*. L'interaction entre les β -lactamines et leurs cibles primaires pourrait déclencher une augmentation des activités des autolysines ou perturber l'équilibre entre les activités de synthèse et d'hydrolyse du peptidoglycane (Tomasz *et al.*, 1970 ; Tomasz et Waks, 1975).

Les autolysines AtlA, AtlB et AtlC constituent les principales enzymes autolytiques chez la souche JH2-2 d'*E. faecalis* (Eckert *et al.*, 2006 ; Mesnage *et al.*, 2008). Leur implication dans l'activité bactériolytique de l'amoxicilline a été évaluée chez *E. faecalis* en analysant la survie de la souche JH2-2 et de son mutant isogénique *atlABC* (Dubée *et al.*, 2011). Cette analyse révèle que le triple mutant est beaucoup moins sensible à l'amoxicilline que la souche sauvage, bien qu'il reste affecté par l'antibiotique. D'autre part, l'exposition de la souche JH2-2 à l'amoxicilline conduit à une diminution de la DO_{600nm} d'environ 10 fois tandis que la mortalité du mutant *atlABC* ne s'accompagne pas d'une chute de la DO_{600nm}. Ces résultats indiquent que les autolysines sont impliquées dans l'activité bactériolytique de l'amoxicilline mais qu'elles ne peuvent pas expliquer à elles seules son action. Les auteurs proposent, au regard des travaux de Bizzini *et al.* (2009) et Kohanski *et al.* (2007), qu'un autre mécanisme pourrait faire intervenir une production de ROS (Dubée *et al.*, 2011).

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'activité antibactérienne de l'amoxicilline chez la souche d'*E. faecalis* JH2-2 en aérobiose ainsi qu'en semi-anaérobiose, condition dans laquelle la production de ROS est limitée. Dans cette expérience, l'amoxicilline est utilisée à une concentration de 0,5 μ g/ml, une dose létale pour cette bactérie. Le traitement de la souche JH2-2 avec l'amoxicilline montre que les survies en aérobiose et en semi-anaérobiose sont similaires (Figure 9A). Ces résultats suggèrent que, contrairement à l'hypothèse, les ROS ne contribuent pas à l'activité bactéricide de l'amoxicilline dans ces conditions expérimentales. Chez *E. coli*, d'autres auteurs ont également indiqué qu'ils n'observaient pas de différence dans l'activité bactéricide de l'ampicilline (un équivalent de l'amoxicilline) dans des conditions aérobies et anaérobies (Keren *et al.*, 2013 ; Liu et Imlay, 2013). Ces résultats contrastent cependant avec une autre étude dans laquelle est démontré que l'activité antibactérienne de l'ampicilline, ainsi que d'autres antibiotiques, est diminuée dans des conditions anaérobies strictes (Dwyer *et al.*, 2014). La contradiction des résultats obtenus dans ces différentes approches pourrait reposer sur les conditions expérimentales (Van Acker

et Coenye, 2017). En effet, Dwyer et ses collaborateurs ont conduit la totalité de leurs expériences dans une chambre anaérobie, contrairement à Liu et Imlay (2013). Pour notre étude, comme pour celle de Keren *et al.* (2013), une telle chambre n'a pas été utilisée. Nos résultats obtenus en l'absence de conditions anaérobies strictes n'excluent pas de façon certaine la contribution des ROS dans l'activité bactéricide de l'amoxicilline. Pour lever l'ambiguïté, nous avons choisi de comparer l'activité antibactérienne de l'amoxicilline (à 0,5 µg/ml) chez la souche JH2-2 et son mutant isogénique *sodA*, hypersensible aux ROS, en aérobiose. Les résultats de cette expérience suggèrent que le mutant *sodA* n'est pas plus sensible à l'amoxicilline que la souche sauvage (Figure 9B). Ces derniers résultats confirment que les ROS ne semblent pas contribuer à l'activité bactéricide de l'amoxicilline dans ces conditions.

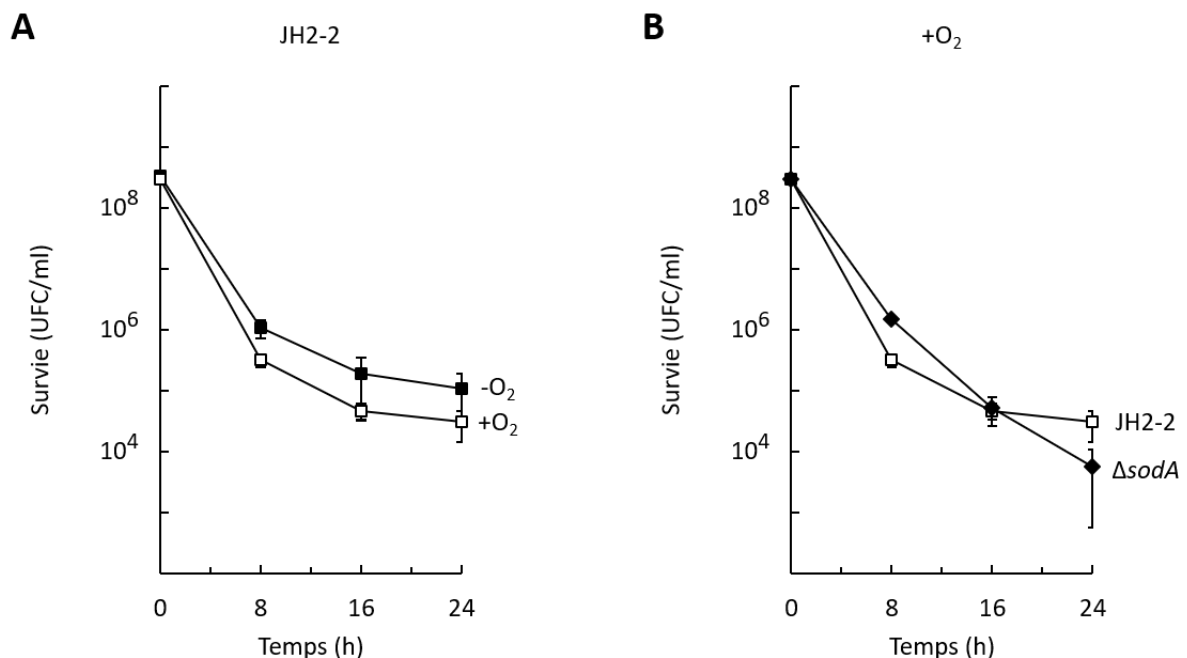


Figure. 9. Activité bactéricide par l'amoxicilline à 0,5 µg/ml indépendante des ROS. A intervalles de temps définis, le nombre de bactéries survivantes suite à un traitement avec 0,5 µg/ml d'amoxicilline a été déterminé et rapporté pour les panneaux A et B. **(A)** La souche d'*E. faecalis* JH2-2 a été traitée en aérobiose (carrés blancs) et en semi-anaérobiose (carrés noirs). **(B)** La souche sauvage (carrés blancs) et son mutant isogénique *sodA* (losanges noirs) ont été traitées en aérobiose. Les résultats sont rapportés comme les moyennes et les écarts-types d'au moins trois expériences indépendantes.

Nous avons également estimé la contribution du phénomène de lyse induit par l'amoxicilline, utilisée à 0,5 µg/ml, chez la souche sauvage et le mutant *sodA* en établissant une cinétique par le suivi de la DO_{600nm} en aérobiose. La mortalité des deux souches, observée dans les premières heures, s'accompagne d'une diminution comparable de la DO_{600nm} (Figure 10), illustrant ainsi l'activité bactériolytique de l'antibiotique.

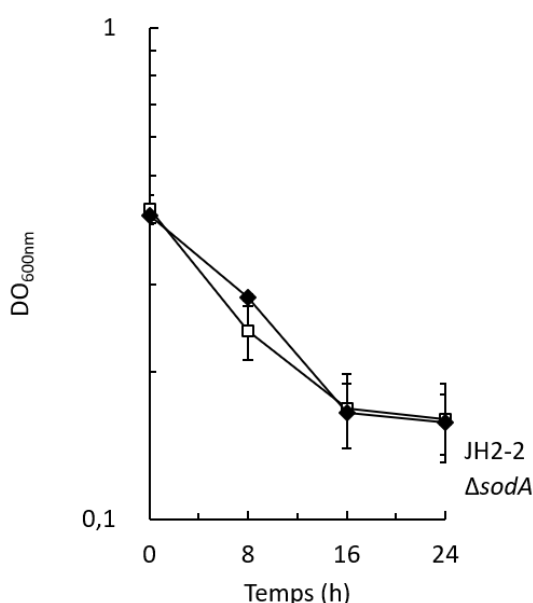


Figure. 10. Cinétique de bactériolyse par l'amoxicilline à 0,5 µg/ml. La DO_{600nm} a été suivie chez la souche sauvage (carrés blancs) et son mutant isogénique *sodA* (losanges noirs) suite à un traitement avec 0,5 µg/ml d'amoxicilline en aérobiose. Les résultats sont rapportés comme les moyennes et les écarts-types d'au moins trois expériences indépendantes.

Les principaux résultats présentés dans notre publication montrent que le mutant *sodA* traité avec 0,25 µg/ml d'amoxicilline, une dose sublétales pour la souche JH2-2, est ~5,5 log₁₀ plus sensible que la souche sauvage après 24 heures d'incubation en conditions aérobies. Ce phénotype est dépendant de la présence d'O₂ et par conséquent suggère qu'un stress oxydatif y contribue. Une production de ROS ainsi que l'activité des autolysines pourraient toutes deux contribuer à l'activité bactéricide de l'amoxicilline. Nous avons donc évalué l'implication des autolysines dans la sensibilité du mutant *sodA* à l'amoxicilline, à 0,25 µg/ml en suivant la DO_{600nm}. Après 8 heures d'incubation, une diminution de la DO_{600nm} est observée pour les deux souches (Figure 11), suggérant que les autolysines contribuent à l'activité antibactérienne de

l'antibiotique. Bien que le mutant *sodA* soit beaucoup plus sensible à l'amoxicilline que la souche sauvage, les suivis de la DO_{600nm} des deux souches sont comparables (Figure 11). Ces résultats indiquent que le mécanisme dépendant des autolysines peut contribuer à l'activité antibactérienne de l'amoxicilline (0,25 $\mu g/ml$) mais pas à l'hypersensibilité du mutant *sodA* à l'antibiotique.

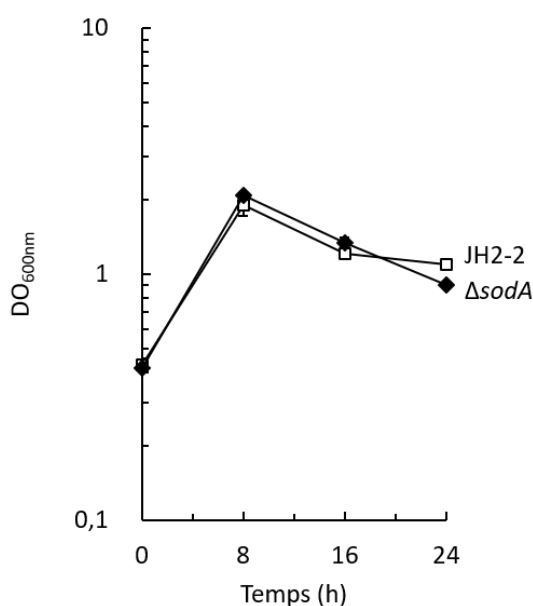


Figure. 11. Cinétique de bactériolyse par l'amoxicilline à 0,25 $\mu g/ml$. La DO_{600nm} a été suivie chez la souche sauvage (carrés blancs) et son mutant isogénique *sodA* (losanges noirs) suite à un traitement avec 0,25 $\mu g/ml$ d'amoxicilline en aérobiose. Les résultats sont rapportés comme les moyennes et les écarts-types d'au moins trois expériences indépendantes.

Ces résultats permettent d'apprécier la cinétique des deux mécanismes précédemment mentionnés. La mortalité du mutant *sodA* suite au traitement avec 0,25 $\mu g/ml$ d'amoxicilline dépend d'une production d' H_2O_2 qui ne se révèle toxique qu'après 16 heures d'incubation, quand l' H_2O_2 atteint des concentrations élevées (>2000 μM – voir chapitre II). Lorsque le phénomène de lyse est plus important (0,5 $\mu g/ml$ d'amoxicilline), les densités bactériennes de la souche sauvage et du mutant *sodA* chutent durant les premières heures, limitant la production d' H_2O_2 et ainsi son accumulation. D'ailleurs, nous n'avons pas détecté d' H_2O_2 dans le surnageant de culture de ces deux souches après traitement avec 0,5 $\mu g/ml$ d'amoxicilline (Figure 12, A et B). Toutefois, ceci n'exclut pas que les cellules survivantes ne produisent pas

plus d' H_2O_2 mais cette production est potentiellement non détectable. L'ensemble de ces résultats indiquent que le mutant *sodA* est tué par un ou deux mécanismes selon la concentration en amoxicilline. A 0,5 $\mu\text{g/ml}$, sa mortalité est due à un phénomène de lyse, probablement via l'activité des autolysines, tandis qu'à 0,25 $\mu\text{g/ml}$, une production d' H_2O_2 contribue également à sa mortalité.

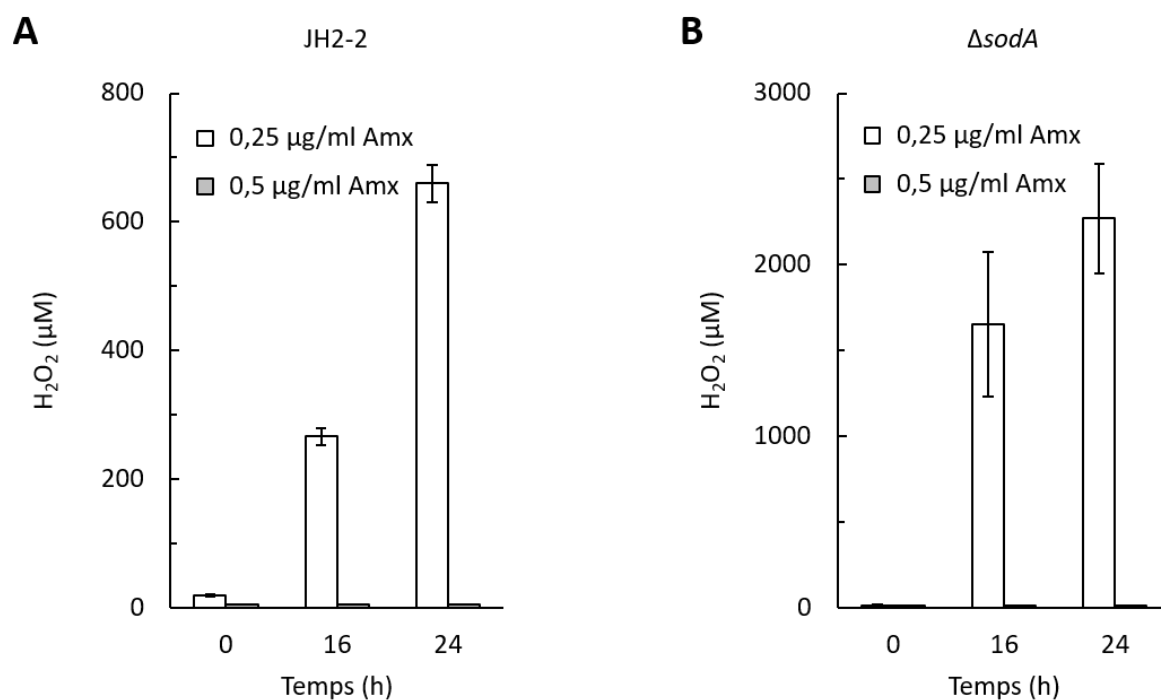


Figure. 12. Détection d' H_2O_2 selon la dose d'amoxicilline. La souche sauvage (A) et son mutant isogénique *sodA* (B) ont été traités avec 0,25 $\mu\text{g/ml}$ (barres blanches) ou 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (barres grises) d'amoxicilline en aérobiose, et les surnageants ont été récupérés à intervalles de temps définis pour déterminer la concentration d' H_2O_2 . Les résultats sont rapportés comme les moyennes et les écarts-types d'au moins trois expériences indépendantes.

Ainsi, l'amoxicilline, comme la vancomycine et la pénicilline (Bizzini *et al.*, 2009 ; Ladjouzi *et al.*, 2013, 2015) peut induire un stress oxydatif chez *E. faecalis*. Cependant, elle ne peut contribuer à l'action de l'antibiotique que lorsqu'elle est déficiente dans son activité de détoxification de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$.

III.2. Une production de ROS indépendante des classes de protéines liant les pénicillines inactivées par les β -lactamines

Les β -lactamines agissent par inactivation des « protéines liant les pénicillines » (PBP pour *penicillin binding protein*), enzymes participant à la synthèse de la paroi. L'analyse du génome d'*E. faecalis* révèle la présence de 6 PBP mais sa sensibilité (CMI) aux β -lactamines, ainsi que le phénomène de lyse, semblent liés à la capacité qu'ont ces antibiotiques à inactiver seulement une PBP, la protéine PBP5 (Arbeloa *et al.*, 2004 ; Williamson *et al.*, 1985). En effet, pour la souche d'*E. faecalis* JH2-2, la lyse induite par l'amoxicilline s'observe à une concentration supérieure ou égale à la CMI (0,5 μ g/ml) et est corrélée à l'inactivation de PBP5. Du fait de la très faible affinité entre les céphalosporines et PBP5, *E. faecalis* présente une résistance de haut niveau à ces antibiotiques (CMI = 512 μ g/ml). Contrairement à PBP5, les protéines PBP2 et PBP3 sont inactivées à de très faibles concentrations. Celles-ci ne sont pas décrites comme « essentielles » parce que leur inactivation par ces antibiotiques n'influence pas la croissance de la bactérie (Mainardi *et al.*, 1995). Comme pour l'amoxicilline, la céfotaxime (une céphalosporine de troisième génération) induit un stress oxydatif chez la souche d'*E. faecalis* JH2-2 (voir chapitre II). L'ensemble des résultats indiquent qu'indépendamment des PBP inactivées par les β -lactamines, ces antibiotiques partagent un mécanisme d'action sur le métabolisme de la souche d'*E. faecalis* JH2-2, faisant intervenir la génération accrue de ROS.

III.3. Comment l' H_2O_2 conduit-il à la mort cellulaire du mutant *sodA* ?

La réponse d'*E. faecalis* à l' H_2O_2 a été bien caractérisée. Elle possède trois peroxydases : l'alkyl hydroperoxyde réductase (AhpCF), la thiol peroxydase (Tpx) et la NADH peroxydase (Npr). Ces enzymes sont toutes impliquées dans la défense contre de l' H_2O_2 exogène, tandis que Npr et Tpx se distinguent par leur rôle supplémentaire dans la protection contre de l' H_2O_2 endogène et l'environnement délétère des macrophages respectivement (La Carbona *et al.*, 2007). De manière surprenante, les concentrations d' H_2O_2 déterminées dans les surnageants de cultures du triple mutant *npr tpx ahpCF* ne sont pas plus élevées que celles du mutant *sodA* (Figure 13A). Pourtant, ce dernier n'est pas plus sensible à l'amoxicilline (0,25 μ g/ml) que la souche sauvage dans nos conditions expérimentales (Figure 13B). Ces

résultats suggèrent que la production d' H_2O_2 induite par l'amoxicilline occasionne des dommages qui ne peuvent être délétères que s'ils sont conjugués à une caractéristique propre au mutant *sodA*.

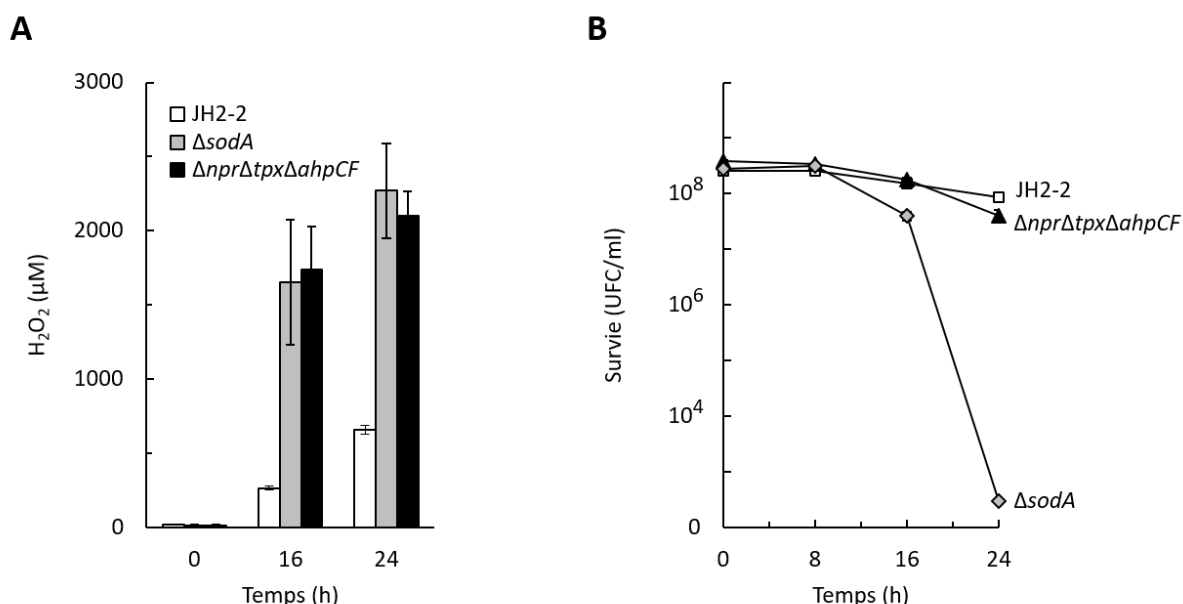


Figure. 13. Corrélation entre l' H_2O_2 et la mortalité, spécifique au mutant *sodA*. La souche sauvage (en blanc) et ses mutants isogéniques *sodA* (en gris) et *npr tpx ahpCF* (en noir) ont été traités avec 0,25 µg/ml d'amoxicilline en aérobiose, et à intervalles de temps définis, la concentration d' H_2O_2 dans les surnageants de cultures (**A**) ainsi que la survie (**B**) des différentes souches ont été déterminées. Les résultats sont rapportés comme les moyennes et les écarts-types d'au moins trois expériences indépendantes.

L'hypothèse la plus probable serait que l'absence d'activité SOD induit également une production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$. Les concentrations intracellulaires d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ et d' H_2O_2 sont déterminantes pour la survie de la bactérie. L' $\text{O}_2^{\cdot-}$, en endommageant les groupements fer-soufre de complexes protéiques, libère du Fe^{2+} . L'interaction de ce dernier avec l' H_2O_2 mène à la formation d' $\text{OH}^{\cdot}$, un oxydant hautement réactif. Ce radical peut endommager la plupart des biomolécules. Bien qu'il puisse oxyder des protéines et des lipides, son impact le plus important est susceptible d'être sur l'ADN, une seule modification pouvant être létale. Une variété de chélateurs de fer peut limiter la disponibilité du fer et ainsi la formation d' $\text{OH}^{\cdot}$. En effet, l'addition de bipyridyl, d'o-phénanthroline et de déféroxamine protège *E. coli* contre de l' H_2O_2 exogène (Imlay *et al.*, 1988).

Au regard de ces résultats, la sensibilité du mutant *sodA* à l' H_2O_2 induit par l'amoxicilline pourrait s'expliquer par la formation d' $\text{OH}\cdot$. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé la survie du mutant en présence et en absence de déféroxamine. L'addition du chélateur de fer ne protège pas le mutant *sodA* du stress oxydatif induit par l'amoxicilline (Figure 14). Ce résultat suggère que la réaction de Fenton, et par conséquent l' $\text{OH}\cdot$, ne semble pas contribuer à la mortalité du mutant. Néanmoins, la déféroxamine est un chélateur de fer non pénétrant qui n'a été que très peu utilisé chez *E. faecalis*. En perspective de ces résultats et pour lever nos doutes, la recherche de dommages oxydatifs de l'ADN est envisagée.

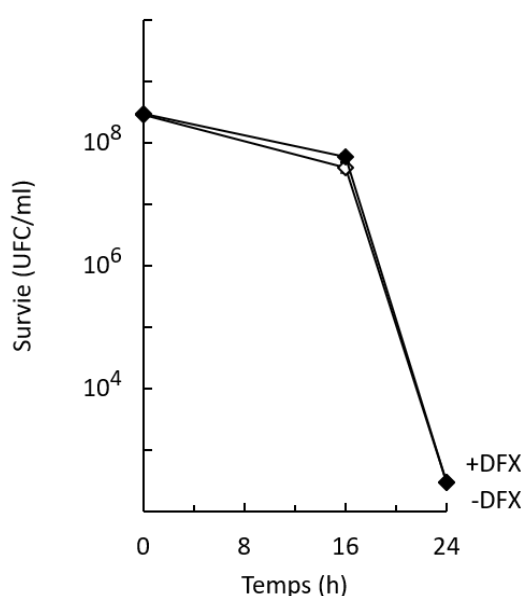


Figure. 14. Mortalité du mutant *sodA* indépendante de l' $\text{OH}\cdot$? Le mutant *sodA* a été traité avec 0,25 $\mu\text{g/ml}$ d'amoxicilline en présence (+ DFX, losanges noirs) ou en absence (-DFX, losanges blancs) de 100 μM de déféroxamine en aérobiose, et à intervalles de temps définis, le nombre de bactéries survivantes a été déterminé. Les résultats sont rapportés comme les moyennes et les écarts-types d'au moins trois expériences indépendantes.

III.4. Relation entre le stress oxydatif et l'action de la céfotaxime chez *E. faecium*, l'autre espèce d'entérocoques d'intérêt clinique

Il y a un an, l'OMS publiait une liste des bactéries ou familles bactériennes les plus inquiétantes, prioritaires pour la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cette liste

comprend la deuxième espèce d'entérocoques responsables d'infections associées aux soins, *E. faecium*, notamment les souches résistantes à la vancomycine (Tableau 1). Motivés par l'importance clinique de ces bactéries, nous avons entrepris la caractérisation de la relation entre le stress oxydatif et les antibiotiques. Afin de déterminer si l'induction d'un stress oxydatif par la céfotaxime chez *E. faecalis* est transposable à *E. faecium*, nous avons envisagé la même stratégie. Pour cela, nous avons tout d'abord analysé *in silico* les acteurs moléculaires jouant un rôle potentiel dans la réponse au stress oxydatif, puis entrepris la mutagenèse des gènes correspondants, et enfin analysé la survie de mutants déficients en défenses antioxydantes vis-à-vis de l'antibiotique. Cependant, si les acteurs de la réponse au stress oxydatif chez *E. faecalis* sont bien documentés (La Carbona *et al.*, 2007 ; Verneuil *et al.*, 2006), ils demeurent très peu connus chez *E. faecium*. La disponibilité de la séquence génomique de la souche d'*E. faecium* AUS0004 a permis de sélectionner différentes protéines potentiellement impliquées dans l'élimination de ROS, lesquelles sont énumérées dans le tableau 9. Ces dernières sont SodA (EFAU004_01348), AhpCF (EFAU004_0875 et EFAU004_0874) et Npr (EFAU004_00475), homologues aux enzymes détoxifiantes d'*E. faecalis*, une catalase de nature différente (EFAU004_00513) et une glutathion peroxydase (Gpx – EFAU004_00461).

Tableau 9. Protéines jouant (ou susceptibles de jouer) un rôle dans la réponse au stress oxydatif et leur présence chez les souches d'*E. faecalis* V583 et d'*E. faecium* AUS0004.

Protéine	Gène chez <i>E. faecalis</i>	Gène chez <i>E. faecium</i>
(Mn)Superoxyde dismutase	EF0469	EFAU004_01348
Alkyl hydroperoxyde réductase	EF2738–9	EFAU004_0874–5
Thiol peroxydase	EF2932	
NADH peroxydase	EF1211	
Catalase	EF1597	
(Mn)Catalase		EFAU004_00513
Glutathion peroxydase		EFAU004_00461

Une mutagenèse systématique des gènes correspondants a été entreprise. Actuellement, les mutants *sodA* et *gpx* ont été obtenus. Nous avons analysé la survie du mutant *sodA* en présence de céfotaxime, utilisée à 1 µg/ml comme précédemment. Le mutant *sodA* semble

légèrement plus sensible que la souche sauvage au traitement antibiotique (Figure 15). Cependant, sa sensibilité est loin d'être comparable à celle du mutant *sodA* d'*E. faecalis* (~5,5 log₁₀ de différence avec la souche parentale), suggérant que le mécanisme de production de ROS stimulé par l'antibiotique chez *E. faecalis* ne semble pas être conservé chez *E. faecium*. Ce résultat peut être envisagé comme une preuve complémentaire de l'implication de DMK dans ce mécanisme. En effet, aucun homologue des gènes codant les activités nécessaires à la synthèse de DMK n'a été identifié chez *E. faecium*.

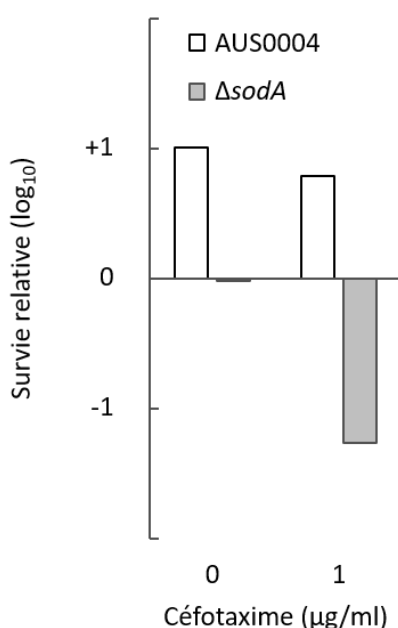


Figure 15. Sensibilité à la céfotaxime du mutant *sodA* chez *E. faecium*. La souche sauvage AUS0004 (barres blanches) et son mutant isogénique *sodA* (barres grises) ont été traités avec 1 μg/ml de céfotaxime en aérobiose. Le nombre de bactéries survivantes a été déterminé 24 heures après l'ajout de l'antibiotique. La survie relative correspond au rapport du nombre d'UFC/ml à T₂₄ sur celui à T₀.

Bien qu'*E. faecium* ne puisse pas synthétiser DMK, les travaux de Huycke *et al.* (1996) indiquent que certaines souches sont, comme *E. faecalis*, d'importantes productrices d'O₂^{•-}, et d'H₂O₂ dérivés. Les mécanismes à l'origine de cette production doivent cependant être caractérisés. Néanmoins, nous avons amorcé l'analyse de la production d'H₂O₂ chez la souche d'*E. faecium* AUS0004. De manière surprenante, les concentrations d'H₂O₂ déterminées dans les surnageants de cultures non traitées après 24 heures d'incubation sont très élevées,

atteignant presque 4 mM, soit 6 fois plus que les concentrations déterminées pour *E. faecalis* lorsque sa production est stimulée par les antibiotiques. En revanche, les mécanismes de production de ROS ne semblent pas être stimulés par l'antibiotique. En effet, qu'*E. faecium* soit traitée ou non avec de la céfotaxime, le niveau moyen d'H₂O₂ reste le même (résultats non présentés).

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

La présente étude s'inscrit au cœur du débat actuel concernant l'action secondaire des antibiotiques bactéricides. A l'initiative de cette discussion, Kohanski *et al.* (2007) ont proposé un mécanisme par lequel l'interaction entre ces antibiotiques et leurs cibles augmente la production de ROS chez les bactéries. Cette dernière serait due à des perturbations métaboliques qui stimuleraient l'oxydation du NADH par la chaîne de transfert d'électrons associées aux membranes. En présence d'O₂ comme accepteur terminal d'électrons, cette hyperactivation de la chaîne respiratoire laisserait « fuir » davantage d'électrons et par conséquent, augmenterait la production de ROS par la bactérie.

E. faecalis exprime une chaîne de transport d'électrons qui lui permet de respirer. Cette dernière a des propriétés intéressantes, différentes selon l'expression de sa cytochrome *bd* oxydase. L'activité de cette protéine d'oxydoréduction, impliquée dans le transport des électrons, nécessite la présence d'hème comme cofacteur. Bien qu'*E. faecalis* ne puisse le synthétiser, il est capable de l'incorporer lorsque celui-ci est présent dans le milieu de culture. Ainsi, en présence d'hème, d'O₂ et par conséquent d'une activité cytochrome *bd* oxydase, la plupart des électrons de la chaîne de transfert d'*E. faecalis* participe à la réduction tétravalente de l'O₂ en eau. En revanche, en absence d'hème, ces électrons sont « bloqués » dans la chaîne respiratoire au niveau de DMK. L'O₂ est réduit sans autre transporteur d'électrons intermédiaire en O₂^{•-} (autoxydation de DMKH₂). Dans ces conditions, l'ensemble de nos résultats démontre clairement que les β-lactamines (des antibiotiques bactéricides) augmentent cette production de ROS chez *E. faecalis*, et viennent donc étayer le modèle de mécanisme de mort cellulaire proposé par Kohanski *et al.* (2007). Nos résultats suggèrent que ces antibiotiques augmentent l'introduction d'électrons dans la chaîne respiratoire. En absence d'hème, le pool de DMK réduites augmente, lequel doit stimuler la formation d'O₂^{•-} selon le modèle présenté dans la figure 16.

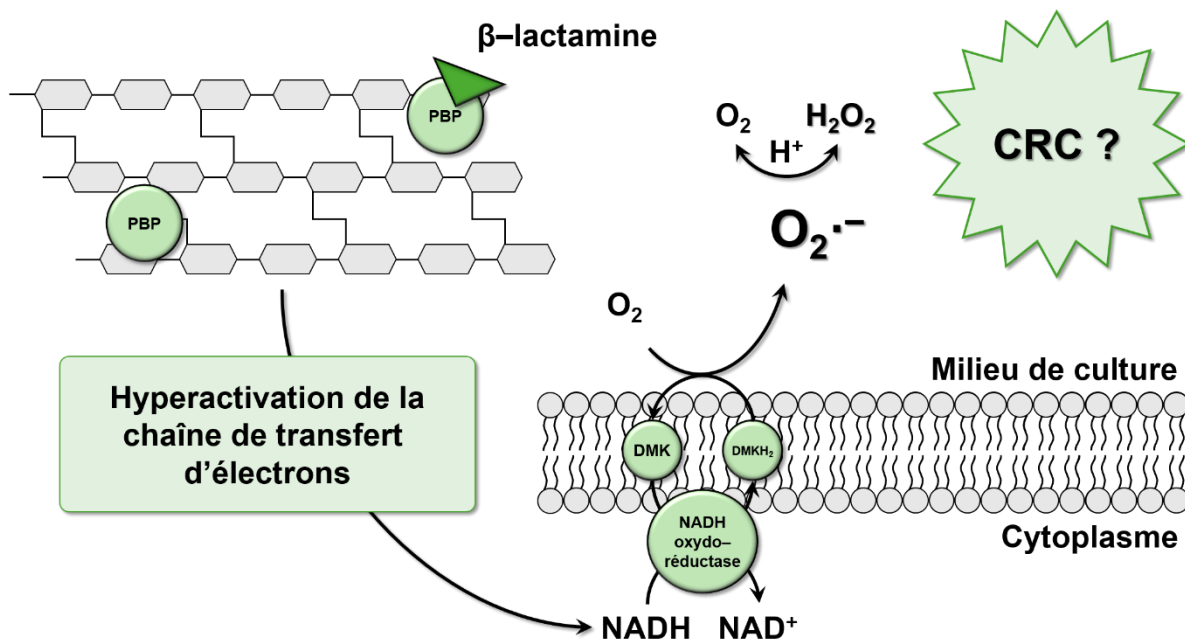


Figure 16. Modèle du mécanisme de production d' $O_2^{\cdot-}$ extracellulaire stimulé par les β -lactamines chez *E. faecalis*. L'interaction entre les β -lactamines et les protéines liant la pénicilline (PBP pour *penicillin binding protein*) stimule l'oxydation du NADH par la chaîne de transfert d'électrons. En absence d'hème, cette hyperactivation de la chaîne respiratoire stimule la formation d' $O_2^{\cdot-}$ extracellulaire par l'autoxydation de DMKH₂.

Avec plus de 600 000 décès causés en 2008, le CRC est le troisième cancer le plus fréquent dans le monde et représente la quatrième cause de mortalité par cancer (après le cancer du poumon, de l'estomac et du foie) (Ferlay *et al.*, 2010). La plupart des CRC se développent selon la séquence « adénome-carcinome » caractérisée par l'accumulation de mutations génétiques et épigénétiques qui finissent par entraîner des lésions bénignes pré-malignes et éventuellement un cancer (Weitz *et al.*, 2005). Les principales causes de développement de CRC comprennent des facteurs liés au mode de vie, comme un régime alimentaire riche en graisses animales, en viande rouge ou transformée, la consommation importante de boissons alcoolisées, ainsi que l'obésité (Rapport American Institute for Cancer Research, 2011).

Au cours de la dernière décennie, l'importance du microbiote intestinal dans l'étiologie du CRC a suscité un vif intérêt. Cependant, malgré une meilleure compréhension des associations entre le microbiote et ce cancer, les mécanismes par lesquels les commensaux l'initient sont encore incertains. Plusieurs travaux suggèrent néanmoins des mécanismes par

lesquels des souches commensales peuvent endommager l'ADN de cellules épithéliales. Parmi ces bactéries, *E. faecalis* est soupçonnée de jouer un rôle dans le développement de CRC par sa capacité à produire de l' $O_2^{\cdot-}$ par l'autoxydation de DMK. En effet, des souris déficientes en interleukine-10 colonisées avec une souche sauvage d'*E. faecalis* productrice d' $O_2^{\cdot-}$ développent à la fois une inflammation et un CRC, tandis que d'autres colonisées avec un mutant *menB* n'aboutissent qu'à une inflammation (Wang *et al.*, 2012).

Récemment, plusieurs études cliniques indiquent que les antibiotiques, et particulièrement les pénicillines, constituent un facteur de risque de développement de CRC (Cao *et al.*, 2017 ; Dik *et al.*, 2016). Les résultats présentés dans ce manuscrit indiquent que les β -lactamines amplifient significativement la production de ROS par l'autoxydation de DMK chez *E. faecalis* (Figure 15). Cette bactérie pourrait par conséquent constituer un candidat de premier choix pour fournir une explication quant à l'augmentation du risque de développement de CRC chez des patients traités avec des β -lactamines. Cependant, l'importance clinique de cette hypothèse demande la confirmation d'études *in vivo*.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Albesa I., M. C. Becerra, P. C. Battán, P. L. Páez**, Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 605–609 (2004).
- Andrewes F. W., T. J. Horder**, A study of streptococci pathogenic for man. *The Lancet.* **168**, 852–855 (1906).
- Andrews J. M.**, Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* **48** Suppl 1, 5–16 (2001).
- Arbeloa A. et al.**, Role of class A penicillin-binding proteins in PBP5-mediated beta-lactam resistance in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **186**, 1221–1228 (2004).
- Arias C. A., B. E. Murray**, The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 266–278 (2012).
- Arriaga-Alba M. et al.**, Antimutagenesis of beta-carotene to mutations induced by quinolone on *Salmonella Typhimurium*. *Arch. Med. Res.* **31**, 156–161 (2000).
- Babior B. M.**, NADPH oxidase: an update. *Blood.* **93**, 1464–1476 (1999).
- Becerra M. C., I. Albesa**, Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 1003–1007 (2002).
- Becerra M. C., P. L. Páez, L. E. Laróvere, I. Albesa**, Lipids and DNA oxidation in *Staphylococcus aureus* as a consequence of oxidative stress generated by ciprofloxacin. *Mol. Cell. Biochem.* **285**, 29–34 (2006).
- Bizzini A., C. Zhao, Y. Auffray, A. Hartke**, The *Enterococcus faecalis* superoxide dismutase is essential for its tolerance to vancomycin and penicillin. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**, 1196–1202 (2009).
- Bourgogne A. et al.**, Large scale variation in *Enterococcus faecalis* illustrated by the genome analysis of strain OG1RF. *Genome Biol.* **9**, R110 (2008).
- Cao Y. et al.**, Long-term use of antibiotics and risk of colorectal adenoma. *Gut* (2017).

Cronan J. E., D. Laporte, Tricarboxylic Acid Cycle and Glyoxylate Bypass. *EcoSal Plus*. **1** (2005).

Dik V. K., M. G. H. van Oijen, H. M. Smeets, P. D. Siersema, Frequent Use of Antibiotics Is Associated with Colorectal Cancer Risk: Results of a Nested Case–Control Study. *Dig. Dis. Sci.* **61**, 255–264 (2016).

Dower W. J., J. F. Miller, C. W. Ragsdale, High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127–6145 (1988).

Dubée V. et al., The *in vitro* contribution of autolysins to bacterial killing elicited by amoxicillin increases with inoculum size in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 910–912 (2011).

Dwyer D. J., M. A. Kohanski, B. Hayete, J. J. Collins, Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* **3**, 91 (2007).

Dwyer D. J. et al., Antibiotics induce redox–related physiological alterations as part of their lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E2100–E2109 (2014).

Dwyer D. J., J. J. Collins, G. C. Walker, Unraveling the physiological complexities of antibiotic lethality. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **55**, 313–332 (2015).

Eckert C., M. Lecerf, L. Dubost, M. Arthur, S. Mesnage, Functional analysis of AtlA, the major N–acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **188**, 8513–8519 (2006).

Ezraty B. et al., Fe–S cluster biosynthesis controls uptake of aminoglycosides in a ROS–less death pathway. *Science*. **340**, 1583–1587 (2013).

Facklam R. R., Comparison of several laboratory media for presumptive identification of enterococci and group D streptococci. *Appl. Microbiol.* **26**, 138–145 (1973).

Falcioni G. C., S. Coderoni, G. G. Tedeschi, M. Brunori, G. Rotilio, Red cell lysis induced by microorganisms as a case of superoxide– and hydrogen peroxide–dependent hemolysis mediated by oxyhemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta.* **678**, 437–441 (1981).

Ferlay J. et al., Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer.* **127**, 2893–2917 (2010).

- Fisher K., C. Phillips**, The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. **155**, 1749–1757 (2009).
- Flahaut S., J. M. Laplace, J. Frère, Y. Auffray**, The oxidative stress response in *Enterococcus faecalis*: relationship between H₂O₂ tolerance and H₂O₂ stress proteins. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**, 259–264 (1998).
- Foulquié Moreno M. R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou, L. De Vuyst**, The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* **106**, 1–24 (2006).
- Frankenberg L., M. Brugna, L. Hederstedt**, *Enterococcus faecalis* heme-dependent catalase. *J. Bacteriol.* **184**, 6351–6356 (2002).
- Franz C. M., W. H. Holzapfel, M. E. Stiles**, Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* **47**, 1–24 (1999).
- Goswami M., S. H. Mangoli, N. Jawali**, Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 949–954 (2006).
- Huycke M. M., W. Joyce, M. F. Wack**, Augmented production of extracellular superoxide by blood isolates of *Enterococcus faecalis*. *J. Infect. Dis.* **173**, 743–746 (1996).
- Huycke M. M. et al.**, Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* requires demethylmenaquinone and is attenuated by functional terminal quinol oxidases. *Mol. Microbiol.* **42**, 729–740 (2001).
- Huycke M. M., D. R. Moore**, *In vivo* production of hydroxyl radical by *Enterococcus faecalis* colonizing the intestinal tract using aromatic hydroxylation. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 818–826 (2002).
- Huycke M. M., V. Abrams, D. R. Moore**, *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis*. **23**, 529–536 (2002).
- Imlay J. A., S. M. Chin, S. Linn**, Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science*. **240**, 640–642 (1988).
- Imlay J. A.**, Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 395–418 (2003).
- Jacob A. E., S. J. Hobbs**, Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J. Bacteriol.* **117**, 360–372 (1974).

Keren I., Y. Wu, J. Inocencio, L. R. Mulcahy, K. Lewis, Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science*. **339**, 1213–1216 (2013).

Kohanski M. A., D. J. Dwyer, B. Hayete, C. A. Lawrence, J. J. Collins, A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*. **130**, 797–810 (2007).

Korshunov S., J. A. Imlay, Detection and quantification of superoxide formed within the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**, 6326–6334 (2006).

Krogstad D. J., A. R. Pargwette, Defective killing of enterococci: a common property of antimicrobial agents acting on the cell wall. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**, 965–968 (1980).

La Carbona S. et al., Comparative study of the physiological roles of three peroxidases (NADH peroxidase, Alkyl hydroperoxide reductase and Thiol peroxidase) in oxidative stress response, survival inside macrophages and virulence of *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* **66**, 1148–1163 (2007).

Ladjouzi R. et al., Analysis of the tolerance of pathogenic enterococci and *Staphylococcus aureus* to cell wall active antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 2083–2091 (2013).

Ladjouzi R. et al., Loss of Antibiotic Tolerance in Sod–Deficient Mutants Is Dependent on the Energy Source and Arginine Catabolism in Enterococci. *J. Bacteriol.* **197**, 3283–3293 (2015).

Lam M. M. C. et al., Comparative analysis of the first complete *Enterococcus faecium* genome. *J. Bacteriol.* **194**, 2334–2341 (2012).

Laplace J. M., A. Hartke, J. C. Giard, Y. Auffray, Cloning, characterization and expression of an *Enterococcus faecalis* gene responsive to heavy metals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 685–689 (2000).

Leenhouts K. et al., A general system for generating unlabelled gene replacements in bacterial chromosomes. *Mol. Gen. Genet.* **253**, 217–224 (1996).

Liu Y., J. A. Imlay, Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science*. **339**, 1210–1213 (2013).

Maguin E., P. Duwat, T. Hege, D. Ehrlich, A. Gruss, New thermosensitive plasmid for gram–positive bacteria. *J. Bacteriol.* **174**, 5633–5638 (1992).

Mainardi J. L., L. Gutmann, J. F. Acar, F. W. Goldstein, Synergistic effect of amoxicillin and cefotaxime against *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1984–1987 (1995).

Maki S., S. Takiguchi, T. Miki, T. Horiuchi, Modulation of DNA supercoiling activity of *Escherichia coli* DNA gyrase by F plasmid proteins. Antagonistic actions of LetA (CcdA) and LetD (CcdB) proteins. *J. Biol. Chem.* **267**, 12244–12251 (1992).

McCallum W. G., T. W. Hastings, A case of acute endocarditis caused by *micrococcus zymogenes* (nov. Spec.), with a description of the microorganism. *J. Exp. Med.* **4**, 521–534 (1899).

Mesnage S., F. Chau, L. Dubost, M. Arthur, Role of N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramidase activities in *Enterococcus faecalis* peptidoglycan metabolism. *J. Biol. Chem.* **283**, 19845–19853 (2008).

Miller J. H., *Experiments in Molecular Genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1972).

Miller W. R., B. E. Murray, L. B. Rice, C. A. Arias, Vancomycin-Resistant Enterococci: Therapeutic Challenges in the 21st Century. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **30**, 415–439 (2016).

Na S. et al., *Enterococcus avium* bacteremia: a 12-year clinical experience with 53 patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**, 303–310 (2012).

Nathan C. F., Mechanisms of macrophage antimicrobial activity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**, 620–630 (1983).

Novogrodsky A., A. Ravid, A. L. Rubin, K. H. Stenzel, Hydroxyl radical scavengers inhibit lymphocyte mitogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 1171–1174 (1982).

Ogier J.-C., P. Serror, Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **126**, 291–301 (2008).

Orla-Jensen S, The lactic acid bacteria. *Memoirs of the Academy of the Royal Society of Denmark. Section of Sciences Series.* **85**, 81–197 (1919).

Patel R., Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **51** Suppl 3, iii13–21 (2003).

Paulsen I. T. *et al.*, Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*. **299**, 2071–2074 (2003).

Poyart C., G. Quesnes, P. Trieu–Cuot, Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 415–418 (2000).

Repine J. E., R. B. Fox, E. M. Berger, Hydrogen peroxide kills *Staphylococcus aureus* by reacting with staphylococcal iron to form hydroxyl radical. *J. Biol. Chem.* **256**, 7094–7096 (1981).

Review on Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations*. (2014).

Riboulet E. *et al.*, Relationships between oxidative stress response and virulence in *Enterococcus faecalis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 140–146 (2007).

Rigottier–Gois L. *et al.*, Large-scale screening of a targeted *Enterococcus faecalis* mutant library identifies envelope fitness factors. *PloS One*. **6**, e29023 (2011).

Rincé A., J. C. Giard, V. Pichereau, S. Flahaut, Y. Auffray, Identification and characterization of gsp65, an organic hydroperoxide resistance (ohr) gene encoding a general stress protein in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **183**, 1482–1488 (2001).

Ross R. P., A. Claiborne, Cloning, sequence and overexpression of NADH peroxidase from *Streptococcus faecalis* 10C1. Structural relationship with the flavoprotein disulfide reductases. *J. Mol. Biol.* **221**, 857–871 (1991).

Sambrook J., E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Sanger F., S. Nicklen, A. R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*. **24**, 104–108 (1992).

Schleifer K. H., R. Kilpper–Balz, Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **34**, 31–34 (1984).

- Setsukinai K., Y. Urano, K. Kakinuma, H. J. Majima, T. Nagano**, Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J. Biol. Chem.* **278**, 3170–3175 (2003).
- Sherman J. M.**, The streptococci. *Bacteriol. Rev.* **1**, 3–97 (1937).
- Shockman G. D., L. Daneo–Moore, R. Kariyama, O. Massidda**, Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins, and autolysis. *Microb. Drug Resist.* **2**, 95–98 (1996).
- Sies H.**, *Oxidative Stress* (Academic Press, London, 1985).
- Sinicrope F. A.**, Sporadic colorectal cancer: an infectious disease? *Gastroenterology.* **132**, 797–801 (2007).
- Swampillai J., M. Liang, R. Fisher, G. Devlin**, *Enterococcus gallinarum* causing native valve endocarditis and aorto–atrial fistula: a case report and literature review. *Echocardiography.* **29**, 873–875 (2012).
- Terzaghi B. E., W. E. Sandine**, Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* **29**, 807–813 (1975).
- Thiercelin M. E.**, Morphologie et modes de reproduction de l'entérocoque. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales.* **11**, 551–553 (1899).
- Tomasz A., A. Albino, E. Zanati**, Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. *Nature.* **227**, 138–140 (1970).
- Tomasz A., S. Waks**, Mechanism of action of penicillin: triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 4162–4166 (1975).
- Touati D., M. Jacques, B. Tardat, L. Bouchard, S. Despied**, Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. *J. Bacteriol.* **177**, 2305–2314 (1995).
- Van Acker H., T. Coenye**, The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic–Mediated Killing of Bacteria. *Trends Microbiol.* **25**, 456–466 (2017).
- Van Tyne D., M. S. Gilmore**, Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* **68**, 337–356 (2014).

Verneuil N. et al., Effects of the *Enterococcus faecalis* hypR gene encoding a new transcriptional regulator on oxidative stress response and intracellular survival within macrophages. *Infect. Immun.* **72**, 4424–4431 (2004).

Verneuil N. et al., Implication of (Mn)superoxide dismutase of *Enterococcus faecalis* in oxidative stress responses and survival inside macrophages. *Microbiology.* **152**, 2579–2589 (2006).

Vijayakrishnan R., A. Rapose, Fatal *Enterococcus durans* aortic valve endocarditis: a case report and review of the literature. *BMJ Case Rep.* (2012).

Walsh C., *Antibiotics* (American Society of Microbiology, 2003).

Wang X., M. M. Huycke, Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* promotes chromosomal instability in mammalian cells. *Gastroenterology.* **132**, 551–561 (2007).

Wang X. et al., 4-hydroxy-2-nonenal mediates genotoxicity and bystander effects caused by *Enterococcus faecalis*-infected macrophages. *Gastroenterology.* **142**, 543–551 (2012).

Weiner L. M. et al., Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **37**, 1288–1301 (2016).

Weitz J. et al., Colorectal cancer. *Lancet.* **365**, 153–165 (2005).

Williamson R., C. le Bouguénec, L. Gutmann, T. Horaud, One or two low affinity penicillin-binding proteins may be responsible for the range of susceptibility of *Enterococcus faecium* to benzylpenicillin. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 1933–1940 (1985).

World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. *Systematic Literature Review Continuous Update Project Report.* (2011).

World Health Organization. *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.* (2017).

Zhang X., J. E. P. Vrijenhoek, M. J. M. Bonten, R. J. L. Willems, W. van Schaik, A genetic element present on megaplasmids allows *Enterococcus faecium* to use raffinose as carbon source. *Environ. Microbiol.* **13**, 518–528 (2011).

Annexe

Annexe

Ce travail de thèse m'a également permis de participer techniquement aux travaux présentés dans la publication suivante, notamment au niveau de la construction de mutants.

Expression profiling in a mammalian host reveals the strong induction of genes encoding LysM domain-containing proteins in *Enterococcus faecium*. Margherita Cacaci, Caroline Giraud, Loïc Léger, Riccardo Torelli, Cecilia Martini, Valentina Palmieri, Brunella Posteraro, Maurizio Sanguinetti, Francesca Bugli, and Axel Hartke.
Article soumis dans la revue « Scientific Reports », 2018.

**Expression profiling in a mammalian host reveals the strong
induction of genes encoding LysM domain–containing proteins in
*Enterococcus faecium***

Margherita Cacaci^{1,2#}, Caroline Giraud^{1#}, Loïc Léger¹, Riccardo Torelli², Cecilia Martini²,
Valentina Palmieri³, Brunella Posteraro⁴, Maurizio Sanguinetti^{2*}, Francesca Bugli^{2#}, and Axel
Hartke^{1#*}

¹ Normandie Univ, UNICAEN, U2RM–Stress and Virulence, 14000 Caen, France.

² Institute of Microbiology, Università Cattolica del Sacro Cuore, Fondazione Policlinico Universitario
Agostino Gemelli, Rome, Italy.

³ Physics Institute, Università Cattolica del Sacro Cuore, 00168, Rome, Italy.

⁴ Institute of Public Health (Section of Hygiene), Università Cattolica del Sacro Cuore, Fondazione
Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Rome, Italy.

*Corresponding authors: axel.hartke@unicaen.fr; Maurizio.Sanguinetti@unicatt.it

These authors contributed equally to this work.

≠ These authors also contributed equally to this work.

Running title: *E. faecium* transcriptome in mice

1 **Summary**

2 *Enterococcus faecium* is an important health care–associated pathogen that is difficult to treat
3 due to the high level of antibiotic resistance of clinical isolates. The identification of new
4 potential therapeutic targets or vaccination strategies is therefore urgently needed. In this
5 regard, we carried out a transcriptomic analysis of the *E. faecium* vancomycin–resistant strain
6 Aus0004, comparing the gene expression of bacteria grown under laboratory conditions and
7 bacteria isolated from an infection site. This analysis highlighted more than 360 genes
8 potentially induced under infection conditions. Owing to their expression profiles, four LysM
9 domain–containing proteins were characterized in more detail. The EFAU004_01059, 1150 and
10 494 proteins are highly homologous, whereas EFAU004_01209 has a unique domain
11 architecture and sequence. The analysis of corresponding mutants showed that all LysM
12 proteins played relevant roles in the infection process of *E. faecium* in mice. The
13 EFAU004_01209 mutant also displayed profound morphological modifications, suggesting it
14 has a role in cell wall synthesis or cell division. Furthermore, the adhesion to kidney cells and
15 growth of the mutant were affected in human urine. All these phenotypes and the surface
16 exposure of EFAU004_1209 identify this protein as an interesting new drug target in *E.*
17 *faecium*.

1 Introduction

2 Enterococci are Gram-positive bacteria that colonize several ecological niches, including the
3 guts of mammals and numerous other animals [1]. These bacteria have emerged as important
4 nosocomial pathogens due to their multiple antibiotic resistances [2]. *Enterococcus. faecalis*
5 and *faecium* are the third and fourth most commonly isolated nosocomial pathogens
6 worldwide, causing up to 14% and 16% of hospital acquired infections in the US and Europe,
7 respectively [3– 5]. *E. faecium* infections, in particular, have become a major concern, since
8 their resistance to vancomycin and ampicillin has increased up to almost 100% in some clinical
9 institutions in the US, and a similar rise in resistances has recently been observed in Europe [6–
10 8]. The ability of *E. faecium* to survive under a range of adverse environmental conditions and
11 the dramatic increase in the antibiotic resistance of clinical isolates highlight the need for the
12 development of alternative treatments and prevention strategies [9]–[10].

13 Well-expressed and abundant proteins, located on the surface of bacteria during the infection
14 process, could be potential targets for new drugs or vaccines [11–13]. To identify these surface
15 proteins in *E. faecium*, we conducted a comprehensive RNA sequencing (RNAseq)
16 transcriptome analysis on the *E. faecium* vancomycin-resistant strain Aus0004 isolated from a
17 bloodstream infection [14]. Transcription profiles during the incubation of the bacteria inside
18 the mice peritoneum were compared to the transcriptome of bacteria grown in standard
19 laboratory conditions. Among the *in vivo* induced polypeptides were four LysM domain–
20 containing proteins, EFAU004_01209, EFAU004_01059, EFAU004_01150 and
21 EFAU004_00494. In a recent study, we highlighted, among others, a LysM domain–containing
22 protein as a promising vaccine candidate in *E. faecium* [15]. The LysM domain is a
23 carbohydrate-binding module conserved across all kingdoms [16]. It is mostly present in
24 bacterial extracellular proteins, including peptidoglycan (PG) hydrolases, adhesins and

virulence factors [17]. Prokaryotic LysM modules bind non-covalently to the N-acetylglucosamine moieties of PG, the main component of the bacterial cell wall [18]. This domain can be present in one or multiple copies and be located at the N- or C-terminal parts of the corresponding proteins [18].

On the basis of the induction of the corresponding genes, we decided to study the physiologic *in vitro* and *in vivo* roles of the LysM domain-containing proteins in *E. faecium* Aus0004.

Results and Discussion

Interpretation of the infection transcriptome of E. faecium

To gain an understanding of the adaptation of *E. faecium* to the host environment and identify cell wall-associated proteins expressed during infection, *E. faecium* strain Aus0004 [14] was inoculated into the mouse peritoneum, and bacteria were recovered 24 hours post-infection. In parallel, bacteria were grown *in vitro* in brain heart infusion broth (BHI) to the exponential mid-log phase ($\text{O.D.}_{600} = 0.4$) and stationary growth phase (24 hour culture). Total RNA from bacteria grown *in vivo* and *in vitro* was extracted, and RNA-seq was performed to analyze the transcriptional activity under these different conditions. Considering a threshold fold change of 2 as significantly differentially expressed, we obtained 715 and 613 overexpressed genes in the analysis of the stationary phase and exponential phase cultures, respectively. Since the physiological state of the bacteria during the infection was unknown, we decided to consider only the overlapping genes between the two analyses, reducing our *in vivo* database to 362 genes. The list of genes identified as up-regulated in both conditions is shown in supplementary table S4.

A comparable study has been previously conducted on *E. faecalis* [19]. The main conclusions that can be drawn from the transcriptome data for both bacteria species is that the strategy *E.*

faecium uses to adapt to host conditions is profoundly different from the strategy of *E. faecalis*. Only two orthologous, *in vivo*-induced operons, overlap between the transcriptomes of the two species; two *E. faecium* paralogous genes, EFAU004_00919 and 01244, overlap with EF0202 of *E. faecalis*, and EFAU004_00560–64 of *E. faecium* overlaps with EF02390–94 of *E. faecalis*. The EFAU004_00919, EFAU004_01244, and EF0202 genes encode phosphopyrimidine kinases converting hydroxymethylpyrimidine monophosphate HMP~P with ATP as the co-factor to HMP~P~P. In *E. coli*, this reaction is part of the biosynthesis pathway of Thiamine~P~P [20]. The loci EFAU004_02390–02394/EF0560–0564 correspond to the *sufCDSUB* operon in both species, which is involved in the assembly of Fe–S clusters in corresponding proteins [21].

While *E. faecalis* induced numerous genes encoding stress defense proteins [19], only four stress genes are induced in *E. faecium*. Two of them encode peptide methionine sulfoxide reductases (Msr) (EFAU004_00288, EFAU004_01188). Methionine (Met) is among the most sensitive amino acids to oxidative damage and is converted into methionine sulfoxide (MetSO). Msr are enzymes that reduce MetSO back to Met [22]. The genome of *E. faecium* strain AUS0004 harbors five genes encoding these activities, and the induction of two of them might indicate that the bacteria were submitted to mild oxidative stress. A further hint that the bacteria were stressed in the peritoneum is the strong induction of two genes encoding the substrate binding domain and transporter ATP-binding subunit of a glycine betaine transport system. This system catalyzes the accumulation of glycine betaine, a compatible solute that alleviates the effects of osmotic stress [23].

A further striking difference between the enterococcal species relates to the induction of ABC transporters. Considerably more of these transporters were induced in *E. faecium* (N°=14) than *E. faecalis* (N°=5). Several of these operons were annotated as amino acid or peptide ABC transporters, and some of them were very strongly induced (>120-fold). The latter observation

1 may be related to the induction of numerous genes encoding peptidases (N°=6) and seems to
2 suggest the bacteria have an increased need for the supply of amino acids inside the mouse
3 peritoneum. This is further supported by the strong induction (nearly 200-fold) of a gene
4 annotated as amino acid permease (EFAU004_00626).

5 The data also seem to reflect that *E. faecium* divides in the peritoneum, since genes encoding
6 key cell division proteins (FtsA: EFAU004_00770, FtsZ: EFAU004_0771, DivIVA:
7 EFAU004_00994, and FtsK: EFAU004_02286) were induced under the *in vivo* conditions. To
8 proliferate, the bacteria had to find nutrients, including an energy source, inside the peritoneum.
9 The transcriptome database of *E. faecalis* highlighted several putative substrates, including
10 glycerol and maltodextrines [19]. In *E. faecium*, glycerol-3-phosphate (glycerol-3-P) is a
11 potential substrate, since a glycerophosphodiester phosphodiesterase (EFAU004_01774) was
12 strongly induced in the peritoneum. This enzyme is implicated in glycerophospholipid
13 metabolism and the hydrolysis of glycerophosphodiester liberates glycerol-3-P. The resulting
14 catabolic enzyme, glycerol-3-P dehydrogenase, generates dihydroxyacetone phosphate, which
15 enters the glycolytic pathway. Interestingly, a gene (EFAU004_02253) encoding this final
16 activity was also significantly induced during peritonitis. Another substrate for the growth of
17 *E. faecium* inside the mouse peritoneum might be ascorbate, since the corresponding operon
18 encoding enzymes implicated in the transport (EFAU004_01270–72, EFAU004_01296) and
19 conversion (EFAU004_1267, 1269, 1273) of ascorbate to D-xylulose-5-phosphate were
20 significantly induced. It has been recently shown that *E. faecalis* can grow on ascorbate as the
21 sole energy source [24], and this might also be the case for *E. faecium*.

22 The *E. faecium* strain AUS0004 is a vancomycin-resistant clinical isolate that harbors a
23 chromosomal *vanB* operon [14] whose expression is induced by the presence of the
24 glycopeptide [25]. However, other stimuli seem to induce expression of the *van*-genes, since
25 the entire operon (EFAU004_02774–79) was highly induced (~16-fold) in bacteria present in

the mouse peritoneum in the absence of the antibiotic. The significance of the induction of the van operon for the infection process of *E. faecium* remains unknown.

A substantial number of the *in vivo* induced genes are implicated in peptidoglycan synthesis and modification. The most important differences in expression concern four penicillin-binding or penicillin-binding domain protein encoding genes (EFAU004_00870, 00997, 01299, 02553) which were induced between 3 and 25-fold in the mouse peritoneum. The *dlt* operon (EFAU004_00725–28) was highly induced. It encodes proteins implicated in the addition of D-alanine to teichoic acids of the cell wall, which results in the reduction of the net anionic charge of the bacterial cell envelope [26]. This D-alanylation of cell wall polymers increases the resistance of bacteria to antimicrobial peptides [26], which are potentially encountered in the peritoneum. Interestingly, among the most highly induced genes *in vivo* are four *E. faecium* genes encoding LysM domain proteins (EFAU004_00494, 01059, 01150, 01209), which show induction factors ranging from 4-fold to 600-fold (Table S4). This might indicate that the corresponding proteins, especially those that are highly induced, are important for the pathogenicity of *E. faecium*. Therefore, we decided to study their role in the infection process in more detail.

General characteristics of the LysM domain-containing proteins of E. faecium

The genes encoding the four LysM domain-containing proteins are very likely organized in monocistronic operons. Compared to EFAU004_1209, which was significantly expressed under laboratory conditions and slightly induced *in vivo*, the genes encoding the three other LysM proteins were weakly expressed *in vitro* but highly induced *in vivo*. The count per million reads (cpm) of the corresponding genes are shown in supplementary table S5. The LysM proteins are comparable in size and have isoelectric points ranging from 202 AA to 212 AA and 4.24 to 4.93. Three genes (EFAU004_00494, 01059 and 01150) were annotated as

1 encoding the endopeptidase M23, although the characteristic HxH motif [27] is absent in these
2 proteins. The three proteins are highly homologous, especially proteins EFAU004_01059 and
3 EFAU004_01150, which differ only by an additional sequence (VQAEP) present nearly in the
4 middle of protein EFAU004_01059 (Fig. 1b). All of the proteins contain a signal sequence at
5 the N terminus followed by the LysM domain harboring the highly conserved YG motif (Fig.
6 1a). No significant homology exists between the abovementioned proteins and
7 EFAU004_01209 (Fig. 1c). Its LysM domain, situated at the C-terminal part of the protein, is
8 more distant from the consensus sequence, even in the well-conserved YG motif. Furthermore,
9 a signal sequence is absent in this protein, but it contains one transmembrane helix (Fig. 1a, c).
10 A Blast analysis with the amino acid sequences of the LysM domain-containing proteins as the
11 input revealed the presence of 97% and 100% conserved orthologues of EFAU004_01150 and
12 EFAU004_01209 respectively, of unknown function in a particular *Clostridioides difficile*
13 strain (strain Y384). Moreover, EFAU004_01150, EFAU004_01059 and EFAU004_00494 are
14 56%, 56% and 51% homologous, respectively, to the secreted LysM protein Sep of
15 *Lactobacillus fermentum* [28].

16 *Construction and characterization of lysM deletion mutants*

17 To evaluate the role of the LysM domain-containing proteins in the *E. faecium* infection
18 process, deletion mutants of EFAU004_00494, EFAU004_01059, EFAU004_01150 and
19 EFAU004_01209 were constructed. Due to the high similarity of EFAU004_01059,
20 EFAU004_01150 and EFAU004_00494 and their therefore expected redundant cellular roles,
21 we also constructed the double mutant Δ EFAU004_01059_01150 and the triple mutant
22 Δ EFAU004_01059-01150_494. The growth of all mutant strains in laboratory medium was
23 comparable to that of the parent strain, as shown in supplementary Fig. S1. However, we
24 noticed that the mutant EFAU004_01209 had the tendency to sediment to the bottom of the test

1 tube, while the wildtype, complemented and other mutant strains grew normally, resulting in
2 uniform turbid medium with few sedimenting cells. (Fig. S2, supplemental materials).
3 Subsequent cell morphology studies by scanning electron microscopy (SEM) showed that,
4 compared to the wild type, the Δ 1209 mutant had an irregular morphology with unseparated
5 daughter cells, suggesting a defect of cell separation (Fig. 2). Transmission electron microscopy
6 (TEM) observations further supported the inhibition of cell separation in the mutant cells (Fig.
7 3). The mutant cells showed anarchic septa formations leading to emergence of mini
8 compartments inside the cells. These alterations were restored in the complemented strain.

9 *Implication of LysM domain-containing proteins in E. faecium virulence*

10 Since the LysM encoding genes were overexpressed during the infection, we postulated that
11 the corresponding proteins might play important roles during infection. We used two different
12 animal model approaches, systemic and urinary tract infections, to detect a possible decrease in
13 the colonization ability of the mutants compared to the wild type. The wild type and the isogenic
14 mutant strains were injected intravenously in Balb/C mice. Seven days post infection, we
15 examined the tissue burdens in the kidneys and livers of the infected mice. As shown in Fig. 4,
16 the single mutants EFAU004_01059 and EFAU004_01150 did not exhibit tissue burden
17 differences compared to the wild type. Conversely, the single mutants Δ EFAU004_00494 and
18 Δ EFAU004_01209 and the double and the triple mutants showed a significantly decreased
19 colonization in the kidneys. The AUS0004 wild-type strain and the mutants displayed a low
20 tropism for liver. The Δ EFAU004_01209 strain and the triple mutant Δ EFAU004_01059–
21 01150–494 showed a decreased tissue burden. Since enterococci can cause urinary tract
22 infections, and the *E. faecium* AUS0004 strain showed high tropism for kidneys in the systemic
23 model, we used a mouse model of urinary tract infection to assess the effect of the deletions.
24 Female Balb/C mice were infected via intra-urethral catheterization, and, 4 days after infection,

1 their bladders and kidneys were homogenized and serial dilution plated to enumerate the CFU
2 per gram of organ. As shown in Fig. 5, the numbers of bacteria recovered from the single
3 mutants Δ EFAU004_1209 and Δ EFAU004_00494, as well as from the double and the triple
4 mutants, were significantly lower than those of the wild-type and the other mutant strains, in
5 accordance with the phenotype detected in the systemic model.

6 *Cell adhesion assay*

7 A possible contribution of the LysM- domain containing proteins in the *E. faecium* adherence
8 process was tested on kidney epithelial cells, as previously described [29]. VERO cells were
9 infected with an MOI of 100:1 with the AUS0004 wild type, the triple mutant
10 Δ EFAU004_01059-01150-494, the Δ EFAU004_01209 single mutant strains and the
11 corresponding complemented strain Δ 1209:1209. Samples were collected at 2 and 24 hours
12 post-infection, and the numbers of adhered cells were enumerated. As shown in Figure 6, the
13 adherence of the triple mutant was comparable to that of the parent strain. In contrast, the
14 adherence of the Δ EFAU004_01209 mutant was significantly reduced compared to that of the
15 wild-type. The decreased ability of the Δ EFAU004_01209 mutant to adhere to kidney
16 epithelial cells could explain its decreased ability to colonize mice kidneys during infection.

17 *LysM domain containing protein EFAU004_01209 is a surface-exposed protein*

18 Unlike the other three highly homologous LysM-containing proteins, the *EFAU004_01209*
19 protein has no conventional leader sequence required for protein export via the general
20 secretory pathway, but it shows a transmembrane helix motive in its N-terminal part.
21 Furthermore, the protein appears to have a role in septum formation during cell division. This
22 set of elements has led us to hypothesize a probable localization of this protein on the surface
23 of the bacterium. To demonstrate that the *EFAU004_01209* protein is a surface-exposed

protein, we overexpressed and purified recombinant rEFAU0004_01209, and mice were subcutaneously immunized to obtain the corresponding polyclonal anti-1209 serum. The specificity of the serum is shown in supplementary Figure S3. The localization of 1209 was determined by immunofluorescence experiments on whole cells using the specific mouse antiserum. A uniform fluorescence distribution around the bacterial cell surface was observed, indicating that the *EFAU004_01209* protein was present on the cell surface of the *E. faecium* strain AUS0004 (Fig. 7a and 7b). We further tested an anti-CcpA serum that recognizes the cytoplasmic protein CcpA [30]. No signal was detected (Fig. 7c), demonstrating that, under our experimental conditions, cytoplasmic proteins were not detected.

LysM domain containing protein EFAU004_01209 might be a promising target for treatment of UTI

Enterococci are leading causes of urinary tract infections (UTI) [31]. Treatment has increasingly been challenging because of their intrinsic and acquired resistances to recently introduced antibiotics [32], and vancomycin-resistant enterococci (VRE), along with multiply resistant enterococcus (MRE) strains, are now common in UTI [33]. We tested the wild-type and mutant strains for growth in human urine and found that the growth of the Δ EFAU004_01209 mutant was strongly affected in this biofluid, whereas its growth in laboratory medium is comparable to that of the parental strain (Fig. 8). Wild type growth was restored in the complemented strain (Fig S4). This interesting finding may identify the peptidoglycan-associated LysM domain-containing protein encoded by the EFAU004_01209 gene as an attractive new drug target for the treatment of UTI caused by multiple resistant *E. faecium* strains.

Conclusions

In conclusion, this work presents for the first time a global transcriptomic analysis of the adaptation of the health care-associated pathogen *E. faecium* to an infection site. This allowed the establishment of a database of *in vivo* induced genes. We focused our efforts on the four genes encoding the LysM domain containing proteins of *E. faecium*, which were significantly induced under infection conditions. These proteins had unknown cellular functions. The most interesting phenotypes were obtained with the Δ EFAU004_01209 mutant. The corresponding gene was significantly expressed both *in vitro* during growth in brain heart infusion broth and *in vivo* during the intra-peritoneal infection, suggesting that it has an important cellular role. The corresponding protein is surface-exposed and indispensable for proper cell division, suggesting its role in cell wall synthesis. The observed morphological modifications are very comparable to those observed for a *sle1* mutant of *Staphylococcus aureus* [34]. These authors showed that the protein encoded by the *sle1* gene had *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase activity. Despite the fact that the EFAU004_01209 gene showed no homology with *sle1*, we conducted a zymographic analysis, as described in the work of Kajimura and collaborators [34]. However, any lytic activity in the *Micrococcus luteus*-gel was detected for the EFAU004_01209 recombinant protein. Work is in progress to define the exact role of the EFAU004_01209 protein in peptidoglycan synthesis. Altogether, the surface-exposed protein EFAU004_01209 could correspond to a new interesting drug target since the absence of this protein reduces significantly the capacity of host colonization.

Regarding the other three LysM domain-containing proteins, EFAU004_01059, EFAU004_01150 and EFAU004_00494 were found to be highly similar, especially EFAU004_01059 and EFAU004_01150. In the systemic and urinary tract infection models, only the infection with the double and the triple mutants resulted in a significantly decreased

tissue burden compared to the wild type, while the only single mutant with a reduced organ colonization ability was EFAU004_00494. This led us to speculate that EFAU004_00494 may have a specific role unrelated to the other two enterococcal proteins, which seem to have redundant roles. Blast analysis revealed a 56% homology with the SS9 LysM domain protein of *Streptococcus suis*, characterized as involved in the virulence of the bacterium; experiments conducted on the SS9 deletion mutant demonstrated that the mutant was more sensitive to the antibacterial activity of host macrophages *ex vivo*. The concentration of free iron in the blood was lower in mice infected with the SS9 mutant compared to the wild type, suggesting that the SS9 protein contributes to virulence by releasing more free iron in the blood of the host [35]. A similar role may be attributed to the three LysM domain-containing proteins, which are also supposed to be secreted outside the cell. Future experiments on survival inside the host will be conducted to verify this hypothesis.

Material and methods

Bacterial strains and growth media

The *E. faecium* strains indicated in supplementary table S1 were grown at 37°C in Brain Heart Infusion (BHI, Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO, USA). To grow the cells on solid media, BHI agar was used. When required, spectinomycin (Sigma–Aldrich) at a final concentration of 500 µg/ml was added.

The *Escherichia coli* strains (supplementary table S1) EC1000, Top10 and BL21 were grown in liquid and solid Luria Bertani (LB Sigma–Aldrich) media. If necessary, kanamycin (50 µg/ml) (Sigma–Aldrich) or spectinomycin (100 µg/ml) was added to the medium.

Human urine was collected from a healthy volunteer who had no history of UTI or antibiotic use in the last 6 months. The urine was centrifuged at 12000×g and sterilized by filtration (0.22 µm-pore size). Since the composition of human urine may be variable, samples were collected on three separate days for three replicate experiments and used by the next day.

Transmission electron microscopy

The cells were rinsed in physiological water and fixed (2.5% glutaraldehyde in 0.1 M RR cacodylate buffer at pH 7.0 containing 0.04% ruthenium red) for 15 hours at 4°C. The cells were then rinsed in RR cacodylate buffer, post-fixed 1 hour with 1% osmium tetroxide in RR cacodylate buffer (at 4°C protected from light), rinsed in RR cacodylate buffer, pelleted in 1.5% agar with a low melting point of 40°C, dehydrated in progressive bath of ethanol (70–100%), embedded in resin (Embed 812) and polymerized for 24 h at 60°C. Ultrathin sections were prepared and compared with uranyl acetate and lead citrate. The cells were observed with the JEOL 1011 transmission electron microscope and images were taken with the ORIUS 200 camera and digital micrograph software.

Scanning electron microscopy

The cells were rinsed in physiological water, fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer at pH 7.0 for 15 hours at 4°C, rinsed in 0.1 M cacodylate buffer at pH 7.0 and sedimented for one week on Thermanox® coverslip coated with poly-L-lysine. The cells were then dehydrated in a progressive bath of ethanol (70–100%) and critical point dried (CPD 030 LEICA Microsystem). The cells were sputtered with platinum and observed with the JEOL 6400F scanning electron microscope.

1 *RNA purification*

2 Total RNA was extracted from the *E. faecium* Aus0004 strain cultured in BHI (Brain Heart
3 Infusion Medium) during the mid-exponential ($OD_{600nm} = 0.3$) or stationary growth phase (24
4 h of culture) and from bacteria recovered from mice peritoneum after infection. Pellets were
5 resuspended in 200 μ l of Max Bacterial Enhancement Reagent (Thermo Scientific, Breda, The
6 Netherlands). This suspension was added to a 2:1 volume of acid phenol (Thermo Scientific)
7 with glass beads and then agitated for 30 min at 30 Hz in the MM200 shaker (Retsch GmbH,
8 Haan, Germany). After 20 minutes of centrifugation, the aqueous phase was taken and
9 transferred to 1 volume of TRIzol (Thermo Scientific), mixed and incubated for 5 min at room
10 temperature. One volume of ethanol was then added. RNA was then purified using Direct-Zol
11 RNA Miniprep (Zymo Research, Irvine, USA CA) according to the manufacturer's
12 instructions.

13 *RNA-sequencing*

14 The RNA-sequencing experiments were performed at the iGE3 genomics platform of the
15 University of Geneva. A total of 1 μ g of total RNA was ribo-depleted using the Ribo-Zero
16 Magnetic Kit for bacteria from Epicentre (Illumina, Wisconsin, USA). Libraries were then
17 prepared using the Illumina TruSeq stranded mRNA kit according to manufacturer's
18 recommendations. Libraries were validated on the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies,
19 Santa Clara, USA) and the Qubit fluorimeter (Thermo Scientific). Samples were multiplexed
20 by 8 and loaded at 8 pM on one lane of an Illumina HiSeq 2500 according to the single read,
21 50-cycle protocol.

1 *Bioinformatic analysis*

2 The sequencing quality control was done with FastQC. [36].The reads were mapped with the
3 TopHat v.2 software to the *Enterococcus faecium* Aus0004 reference [37; 14]. The table of
4 counts with the number of reads mapping to each gene feature of the Aus0004 reference genome
5 was prepared with HTSeq v0.6p1 (htseq-count). The differential expression analysis was
6 performed with the R/Bioconductor statistical analysis package EdgeR v. 3.4.23 [38]. The
7 counts were normalized according to the library size and filtered. The genes with a count above
8 1 count per million reads (cpm) in at least 2 samples were kept for further analysis. The
9 differentially expressed gene tests were statistically assed with the exact test in EdgeR. The
10 differentially expressed gene p-values were corrected for multiple testing error with a 5% FDR
11 (false discovery rate). The correction used was Benjamini–Hochberg (BH).

12 *Mutants construction*

13 To generate deletion mutants for the EFAU004_00494, EFAU004_01059, EFAU004_01150
14 and EFAU004_01209 genes, we used the thermosensitive PWS3 vector. The plasmids used in
15 this study are listened in supplementary table S2. [39].

16 Regions 1 kb upstream and downstream of the genes of interest were amplified by the Kapa
17 HiFi PCR mix (Kapa Biosystem, Wilmington, Massachusetts, USA) using the primers listed in
18 supplementary table S3. The purified PCR products were used as a template for overlapping
19 PCR (primers FW2 and RV5, table S3). The samples were then digested with the restriction
20 enzymes (New England Biolabs) indicated in table S3 and ligated in PWS3. The resulting
21 vectors were then inserted into the *E. faecium* Aus0004 genome by electrotransformation
22 followed by homologue recombination and excision, as previously described [39], [40]. The
23 effective deletion was confirmed by PCR and the sequencing of regions of interest.

For complementation, the entire EFAU004_01209 gene with its promoter and the regions between 1597888 – 1598925 (genomic coordinates) and 1598926 – 1599972 were amplified using the Kapa HiFi PCR mix (Kapa Biosystem, Wilmington, Massachusetts, USA) using the primers listed in table S3. The purified products were used for overlapping PCR (primers OCG119 and OCG124). The resulting products were digested with SacII and SpeI (NEB) and cloned into the vector pWS3 [39]. The vector was electroporated into the Δ 1209 strain to obtain the single copy chromosomal *trans*-complemented strain, following the protocol described for the construction of the mutant.

Expression of recombinant EFAU004_01209

The EFAU004_01209 PCR purified product was cloned into the pETSumo vector (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. The expression and purification of the recombinant EFAU004_01209 (rEFAU004_01209) under native conditions was performed as described previously [41]. The eluted rEFAU004_01209 protein was dialyzed against PBS (phosphate-buffered saline).

Bacterial infection of mice

For *in vivo* RNA preparation, the enterococcal cells were grown overnight and then pelleted and resuspended in 5 ml of phosphate-buffered saline (PBS) for injection. Mice were infected by intraperitoneal injection of 1000 μ l, corresponding 10^7 to 10^8 cells. Twenty-four hours after inoculation, the bacteria and eukaryotic cells were collected by peritoneal washing. The eukaryotic cells were then lysed in ice-cold water for 45 minutes. The bacteria were resuspended in PBS, and serial dilutions were made on TSA medium to quantify recovery.

For the intravenous infection model, overnight cultures of the strains were centrifuged, and pellets were resuspended in PBS at final concentrations of 10^9 bacteria/ml. A total of 100 μ l

from each strain was injected into 10 female BALB/c mice (10 weeks old; Harlan Italy S.r.l., Udine, Italy) through the tail vein. Mice were euthanized by cervical dislocation 7 days after infection. Kidneys and livers were then removed, weighed, and homogenized using a stomacher (model 80; Pbi International, Milan, Italy). Serial homogenate dilutions were plated onto enterococcus–selective agar (Fluka Analytical, Switzerland) for CFU determination. The CFU counts were analyzed by the unpaired *t*–test.

Overnight–grown strains were centrifuged, and pellets were resuspended in PBS to achieve final concentrations of 10^9 C.F.U. /ml. Ten six–weeks–old female mice were infected via intraurethral catheterization (polyethylene catheter, 4 cm long; outside diameter, 0.61 mm; Becton Dickinson, Sparks, MD) with 100 μ l of each strain suspension. Mice were sacrificed four days after transurethral challenge, and the bladders and kidneys were excised, weighed, and homogenized with a Stomacher 80 device (PBI International, Italy) for 120 s at a high speed. Serial homogenate dilutions were plated for CFU determination. The CFU counts were analyzed by the unpaired *t*–test.

Production of polyclonal antiserum

To obtain an anti–EFAU004_1209 serum, two male BALB/c mice (6 to 8 weeks old; 25 to 30 g) were immunized with recombinant purified rEFAU004_1209. Animals were immunized subcutaneously with 25 μ g of rEFAU004_1209 in Freund’s complete adjuvant, and then two boosters containing the same amount of protein/adjuvant were given at 3–week intervals. Three weeks after the final inoculation, mice were injected intraperitoneally with 10 μ g of rEFAU004_1209 mixed with uncomplete Freund’s adjuvant. Animals were bled 2 weeks after each booster, and sera were tested for anti–rEFAU004_1209 antibody titer by immunoblotting.

1 *Immunofluorescence*

2 For the immunofluorescence staining, whole cells of the AUS004 wild-type strain,
3 Δ EFAU004_1209 and the triple mutant strains, grown overnight, were fixed with PBS
4 containing 4% paraformaldehyde for 5 minutes and then incubated overnight with a polyclonal
5 antiserum against rEFAU004_1209 that was generated in mouse. The bound antibodies were
6 detected by incubation for 1 hour with fluorescein isothiocyanate (FITC) coupled anti-mouse
7 antibodies (Sigma). A total of 15 μ l of the sample was applied to a glass slide, air dried, and
8 heat fixed. The analysis was performed with a confocal microscope (Eclipse Ti-E Nikon). Pre-
9 immune antiserum from the same animal was used as a negative control. In the same
10 experiments, the same strains were also considered without the incubation with the primary
11 antibody.

12 *Cell adhesion assay*

13 Kidney epithelial cells from monkey (VERO-cells) were cultured in Dulbecco's-modified
14 Eagle medium (DMEM) (Gibco, Invitrogen, United Kingdom) supplemented with 10% heat-
15 inactivated fetal calf serum (Integro B.V., Zaandam, The Netherlands), 1% nonessential amino
16 acids (Gibco), and 1 mM glutamine (Gibco) and incubated in a humidified, 37°C incubator with
17 5% CO₂. Differentiated VERO cells were prepared by seeding cells from passages 25 to 45 in
18 12-well tissue culture plates (Costar) at 1.6×10^5 cells/ml in DMEM, with all supplements. The
19 culture medium was replaced every second day. Overnight-grown cultures of AUS0004,
20 Δ EFAU004_01209, the complemented strain and the triple mutant were diluted (1:100) and
21 grown at 37°C to an OD₆₆₀ of 0.4. Bacteria were harvested by centrifugation and resuspended
22 in DMEM to a concentration of 1×10^7 CFU/ml. For each strain, 1 ml bacterial suspension was
23 added to the wells (100 bacteria per cell). Plates were centrifuged and incubated for 1 h at 37°C.
24 After incubation, monolayers were rinsed three times with DMEM/EMEM, and cells were

lysed with 1% Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Germany) in PBS for 5 min at room temperature. The adherent bacteria were quantified by plating serial dilutions on BHI agar plates and counting CFU. The inoculum was plated to determine viable counts. The assay was performed in triplicate and repeated twice.

Ethics statement

The mouse experiments were performed under a protocol approved by the Institutional Animal Use and Care Committee at the Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy (Protocol N° 903/2017-PR) and authorized by the Italian Ministry of Health, according to Legislative Decree 116/92, which implemented the European Directive 86/609/EEC on laboratory animal protection in Italy. Animal welfare was routinely checked by veterinarians of the Service for Animal Welfare.

Acknowledgments

RNA-sequencing experiments were performed at the iGE3 genomics platform of the University of Geneva (<http://www.ige3.unige.ch/genomics-platform.php>), and the TEM experiments were performed at the CMAbio microscopy platform of the University of Caen Normandy. We respectively thank Mylène Docquier and Didier Goux for their expertise. We thank Willem van Schaik for the generous gift of the pWS3 plasmid. The expert technical assistance of Anne-Cécile Appourchaux, University of Caen Normandy, was greatly appreciated.

1 Author contributions

2 Conceived and designed the experiments: MC, CG and FB; Performed the experiments: MC,
3 LL, RT, CM, VP; Analysed the data: MC, CG and AH; Contributed
4 discussion/reagents/materials/analysis tools: MS, AH, FB ; Wrote the paper: MC, CG, MS,
5 FB and AH.

References

1. Nelson, I., Agudelo, H. and Huycke.M.M. Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment in *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. (ed. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N.) Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. (2014).
2. Murray, B.E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N Engl J Med*. **342**,710–721 (2000).
3. Zarb, P. et al. The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of health care associated infections and antimicrobial use. *Euro Surveill*. **17**, 46 (2012).
4. Sievert, DM. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infect Control Hosp Epidemiol*. **34**, 1–14 (2013).
5. Werner, G. et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill*. **13**, 47 (2008).

6. Arias, CA., Murray, BE. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century—a clinical superchallenge. *N Engl J Med.* **360**, 439–443 (2009).
7. Top, J. Willems R, van der Velden S, Asbroek M, Bonten M. Emergence of clonal complex *Enterococcus faecium* in The Netherlands. *J Clin Microbiol.* **46**, 214–219 (2008).
8. Treitman, A., Yarnold, P. Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). *J Clin Microbiol.* **43**, 462–463 (2005).
9. Fisher, K., Phillips, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* **155**, 1749–1757 (2009).
10. Sava, IG., Heikens, E., Huebner, J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect.* **16**, 533–540 (2010).
11. Lin, J., Huang, S., Zhang Q. Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes Infect* **4**, 325–331(2002).
12. Olaya-Abril, A., Jiménez-Munguía, I., Gómez-Gascón L, Obando, I., Rodríguez-Ortega, MJ. Identification of potential new protein vaccine candidates through pan-surfomic analysis of pneumococcal clinical isolates from adults. *PLoS One* **8**, e70365(2013).
13. Barinov, A. et al. Prediction of surface exposed proteins in *Streptococcus pyogenes*, with a potential application to other Gram-positive bacteria. *Proteomics.* **9**, 61–73 (2009).
14. Lam, MM. et al. Comparative analysis of the first complete *Enterococcus faecium* genome. *J Bacteriol.* **194**, 9:2334–41. (2012).
15. Romero-Saavedra, F. et al. Identification of peptidoglycan-associated proteins as vaccine candidates for enterococcal infections. *PLoS One.* **9**, 11 (2014).

16. Buist, G., Steen, A., Kok, J., Kuipers, OP. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Molecular. Microbiology*. **68**, 4:838–847 (2008).
17. Visweswaran, GR., Leenhouts, K., van Roosmalen, M., Kok, J., Buist G. Exploiting the peptidoglycan-binding motif, LysM, for medical and industrial applications *Appl Microbiol Biotechnol*.**98**, 4331–4345 (2013).
18. Mesnage, S. et al. Molecular basis for bacterial peptidoglycan recognition by LysM domains. *Nature communication*. **5**, 4269 (2014).
19. Muller, C. et al. The Intraperitoneal Transcriptome of the Opportunistic Pathogen *Enterococcus faecalis* in Mice. *PLoS One*. **10**, 5 (2015).
20. Nakayama, H., Hayashi, R. Biosynthetic pathway of thiamine pyrophosphate: a special reference to the thiamine monophosphate-requiring mutant and the thiamine pyrophosphate-requiring mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **12**, 1118–26 (1972).
21. Roche B, Aussel L, Ezraty B, Mandin P, Py B, Barras F. Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: formation, regulation and diversity. *Biochim Biophys Acta*; **1827**, 3:455–69. (2013).
22. Boschi-Muller, S., Olry, A., Antoine, M., Branlant, G. The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases. *Biochim Biophys Acta*. **1703**, 2:231–8 (2005).
23. Mendum, ML., Smith, LT. Characterization of glycine betaine porter I from *Listeria monocytogenes* and its roles in salt and chill tolerance. *Appl Environ Microbiol*. **68**, 2:813–9 (2002).
24. Mehmeti, I., Solheim, M., Nes, IF., Holo, H. *Enterococcus faecalis* grows on ascorbic acid. *Appl Environ Microbiol*. **79**, 15:4756–8. (2013).
25. Arthur, M., Quintiliani, R. Regulation of VanA- and VanB-Type Glycopeptide Resistance in Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. **45**,2:375–81 (2001).

26. Peschel, A and Sahl, HG. The co–evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol.* **4**, 529–536 (2006).
27. Hooper, NM. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* **354**,1:1–6 (1994).
28. Mark S. Turner, Louise M. Hafner, Terry Walsh, and Philip M. Giffard. Identification and Characterization of the Novel LysM Domain–Containing Surface Protein Sep from *Lactobacillus fermentum* BR11 and Its Use as a Peptide Fusion Partner in *Lactobacillus* and *Lactococcus*. *Applied and Environmental Microbiology.* **70.** 6, 3, 673–3680. (2004).
29. Le Breton, F. et al. AsrR Is an Oxidative Stress Sensing Regulator Modulating *Enterococcus faecium* Opportunistic Traits, Antimicrobial Resistance, and Pathogenicity. *Plos Path* **8**, 8:1002834 (2012).
30. Küster E., Luesink E. J., de Vos W. M., Hillen W. Immunological cross–reactivity to the catabolite control protein CcpA from *Bacillus megaterium* is found in many Gram–positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **39**,109–115. (1996).
31. Flores–Mirelesa, AL. et al. Antibody–Based Therapy for Enterococcal Catheter–Associated Urinary Tract Infections. *Mbio.* **5**, 01653–16 (2016).
32. Miller, WR., Munita, JM., Arias, CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther.***12**, 10:1221–36 (2014).
33. Escaut, L. et al. Eradication of an outbreak of vancomycin–resistant *Enterococcus* (VRE): the cost of a failure in the systematic screening. *Antimicrob Resist Infect Control.* **7**, 2:189–192 (2013).
34. Kajimura, J et al. Identification and molecular characterization of an N–acetyl–muramyl–L–alanine amidase Sle1 involved in cell separation in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* **58**, 4: 1087–110. (2005).
35. Wu, Z. et al. A *Streptococcus suis* LysM domain surface protein contributes to bacterial virulence. *Vet Microbiol.* **1**, 187:64–69. (2016).

36. Wang, L., Wang, S., Li, W. RSeQC: Quality Control of RNA-seq experiments. *Bioinformatics*. **28**, 16: 2184–2185 (2012).
37. Trapnell, C., Pachter, L., Salzberg, SL. TopHat: discovering splice junctions with RNASeq. *Bioinformatics*. **25**, 9: 11005–1111 (2009).
38. Robinson, MD., McCarthy, DJ. and Smyth, GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. **26**, 139–140 (2010).
39. Zhang, X., Vrijenhoek, JE., Bonten, MJ., Willems, RJ., van Schaik, W. A genetic element present on megaplasmid allows *Enterococcus faecium* to use Raffinose as carbon source. *Apl. Envirom. Microbiol.* **13**, 2:518–528 (2011).
40. Leenhouts, K. et al. MolA general system for generating unlabelled gene replacements in bacterial chromosomes *Gen Genet.* **253**, 217–24 (1996).
41. Bugli, F. et al. Synthesis and characterization of different immunogenic viral nanoconstructs from rotavirus VP6 inner capsid protein. *Int J Nanomedicine*. **9**, 2727–39 (2014).

Figure legends

Figure 1. Domain organization and alignment of *E. faecium* LysM domain-containing proteins.

A. Domain organization of the LysM-containing proteins. EFAU004_00494, EFAU004_01150 and EFAU004_01059 have the same organization, whereas EFAU004_01209 is organized differently. Red circle: signal peptide; blue square: LysM domain; yellow triangle: transmembrane domain.

B. Clustal Omega alignment of proteins EFAU004_00494, EFAU004_01150 and EFAU004_01059. The signal peptide and the conserved YG domain are boxed. The LysM domain is indicated by the black line below the alignment.

C. Sequence of the EFAU004_01209 LysM protein. The transmembrane helix and the LysM motif are highlighted in yellow and blue, respectively.

Figure 2. Scanning electron microscopy images of: A–B: AUS0004. C–D: Δ EFAU004_01209 deletion mutant. E and F: Δ 1209:1209 complemented strain. A and C: bar =10 μ m. B: bar = 1 μ m D, E, F: bar=2 μ m.

Figure 3. Transmission electron microscopy images of: A and D: AUS0004; B and E: AUS0004 Δ 1209 deletion mutant, C and F: AUS0004 Δ 1209:1209 complemented mutant. A – C: bar = 0.5 μ m. D and F: bar = 0.1 μ m. E: bar = 0.2 nm.

Figure 4. Effect of AUS0004 (wild-type strains) and the deletion mutants in a mouse model of systemic infection. Groups of 10 BALB/c female mice were injected intravenously with approximately 1×10^8 cells of the indicated strains. Data are expressed as the log₁₀ colony–

forming units (CFUs)/g of bacteria recovered from kidney and liver homogenates seven days after the challenge. The log₁₀ CFUs of both kidneys were combined and averaged. A value of 0 was assigned to the uninfected organs. Horizontal bars represent geometric means. Log₁₀ counts were compared for statistical significance by two-way ANOVA. P values < 0.05 were considered significant. * = < 0.05 ** = < 0.005 *** = < 0.001.

Figure 5. Effect of AUS0004 (wild-type strains) and the deletion mutants in a mouse model of urinary tract infection. Groups of 10 BALB/c female mice were transurethrally challenged with approximately 1×10^8 cells of the indicated strains. Data are expressed as the log₁₀ colony-forming units (CFUs)/g of bacteria recovered from kidney and urinary bladder homogenates four days after the challenge. The log₁₀ CFUs of both kidneys were combined and averaged. A value of 0 was assigned to the uninfected organs. Horizontal bars represent geometric means. Log₁₀ counts were compared for statistical significance by two-way ANOVA. P values < 0.05 were considered significant. * = < 0.05 ** = < 0.005 *** = < 0.001.

Figure 6. Adherence of *E. faecium* AUS0004 wild type and its isogenic mutant strains, the triple mutant Δ EFAU004_01059:01150:494 and the single Δ EFAU004_01209 mutant, and the complemented strain Δ EFAU004_01209:1209 to kidney epithelial VERO cells after two and twenty-four hours. Cells were infected with an MOI of 100:1. Adherent bacteria were collected after 2 and 24 hours and enumerated by plating serial dilutions on BHI agar plates and counting CFU. The bars indicate standard deviations. The assay was performed in triplicate and repeated twice. The analysis was performed by two-way ANOVA. p values < 0.01 were considered significant. ** p = 0.001.

Figure 7. Immunofluorescence microscopy of the enterococcal strains labeled with anti-1209 serum coupled with fluorescein isothiocyanate (FITC) (green); cells are stained with

1 Evans blue. A) Aus0004 wild-type strain shows green fluorescence, indicating a possible
2 surface localization of the EFAU004_1209 protein. B) Δ 1050–1150–494. C) Anti-CcpA serum
3 on total protein extracts of the *E. faecalis* JH2–2 strain; no immunofluorescence signal is
4 detected due to the cytoplasmic localization of the CcpA protein.

5 **Figure 8. Growth in human urine.** Bacteria were inoculated in filtered urine and incubated
6 for 7.5 hours at 37°C, and CFU/ml counts determined for the wild-type strain and the
7 Δ EFAU00_01209 mutant. The assay was performed in duplicate. Error bars represent the
8 standard deviations.

Figure 1

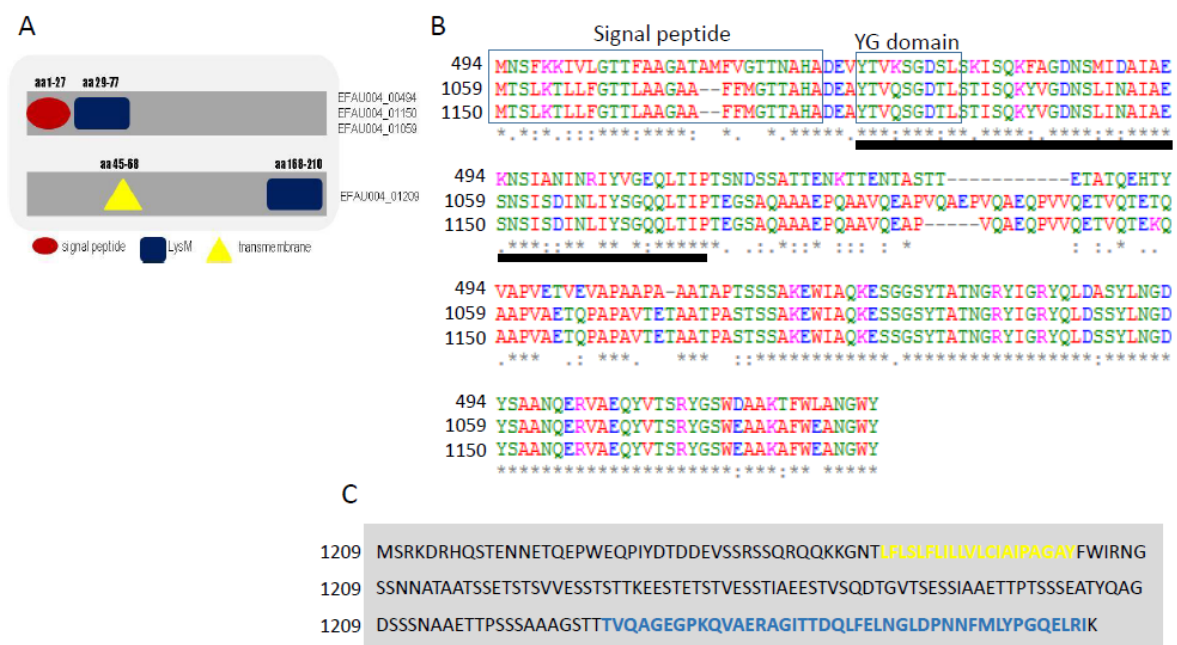


Figure 2

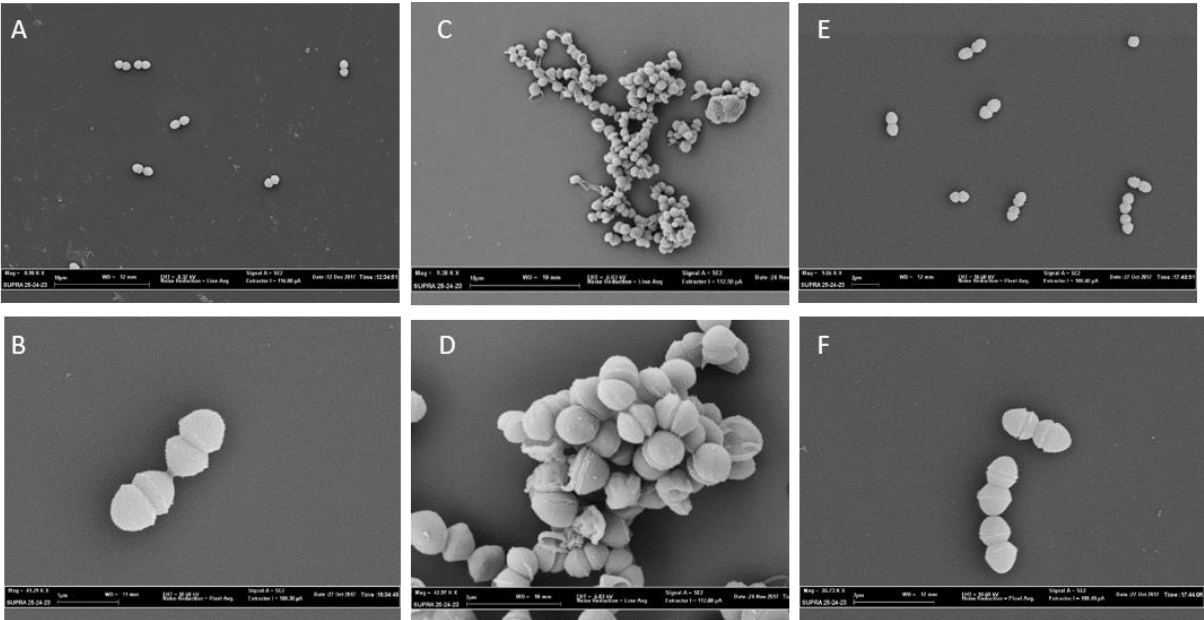


Figure 3

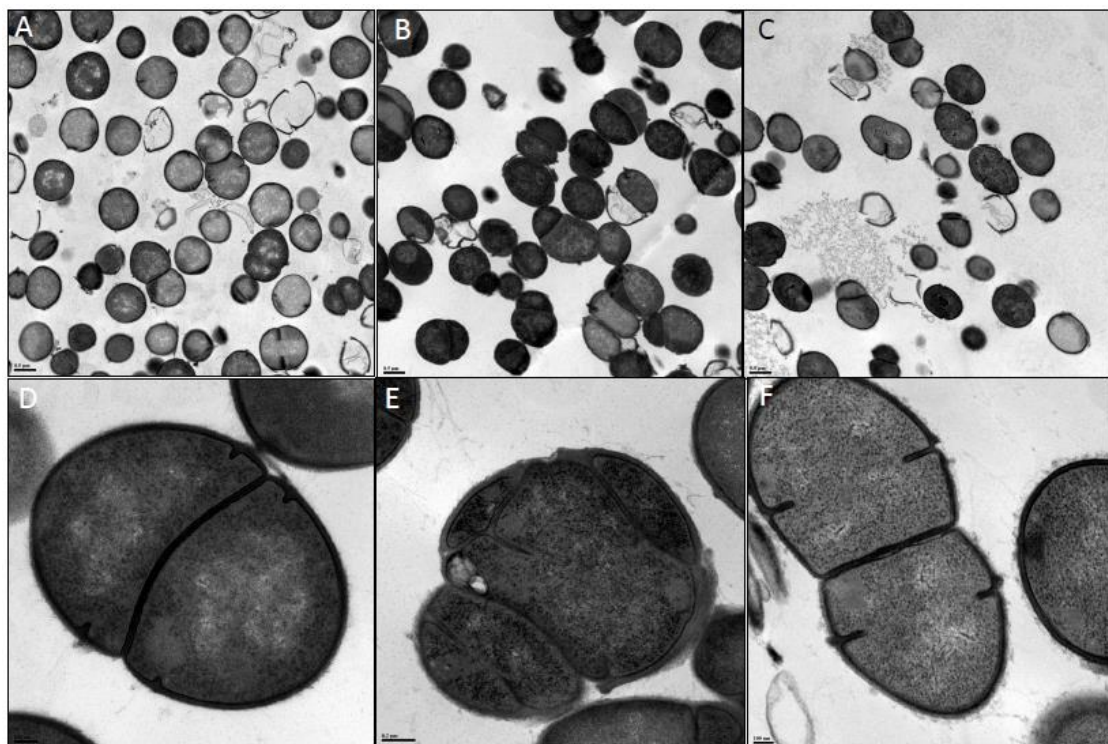


Figure 4

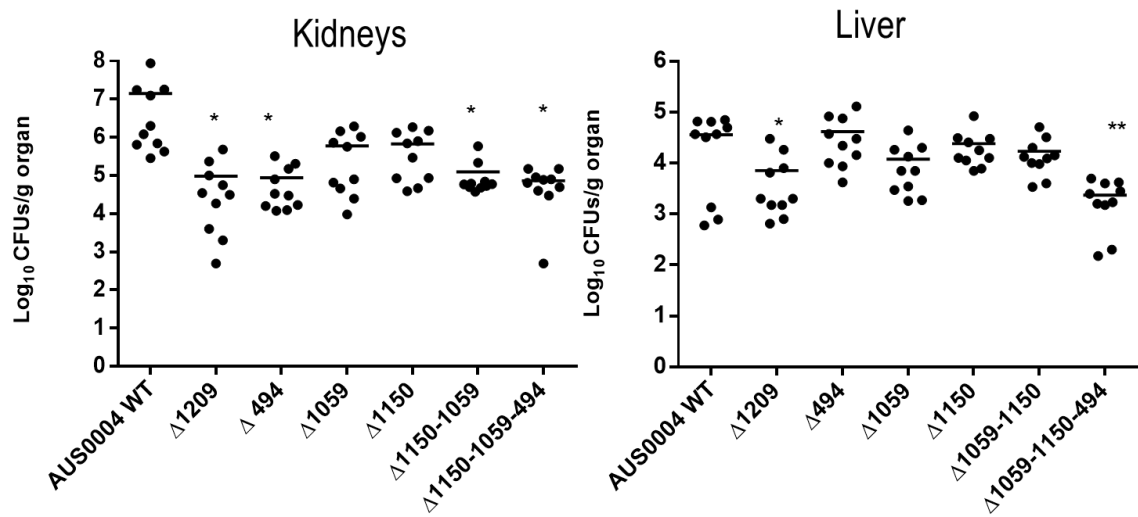


Figure 5

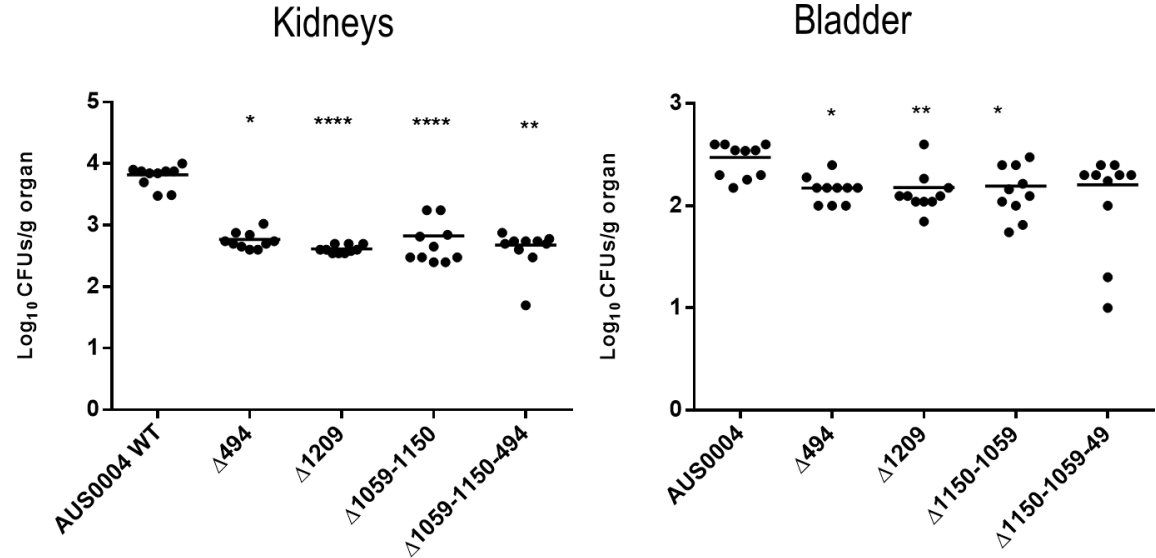


Figure 6

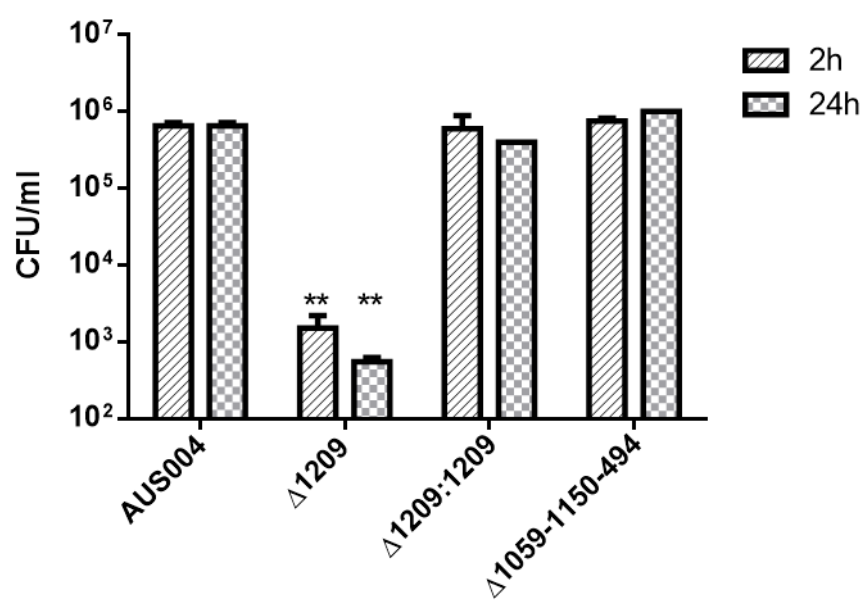


Figure 7

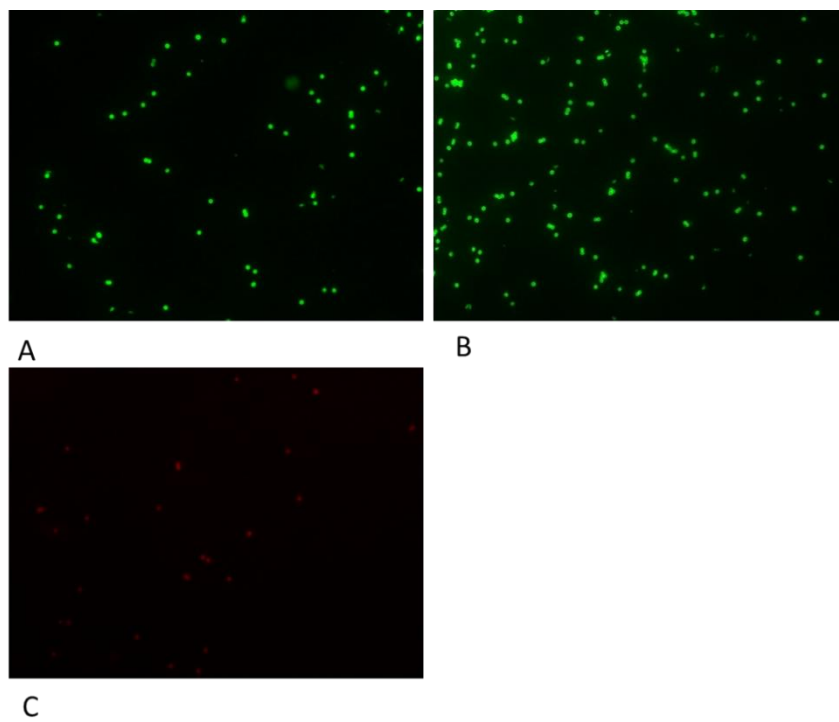
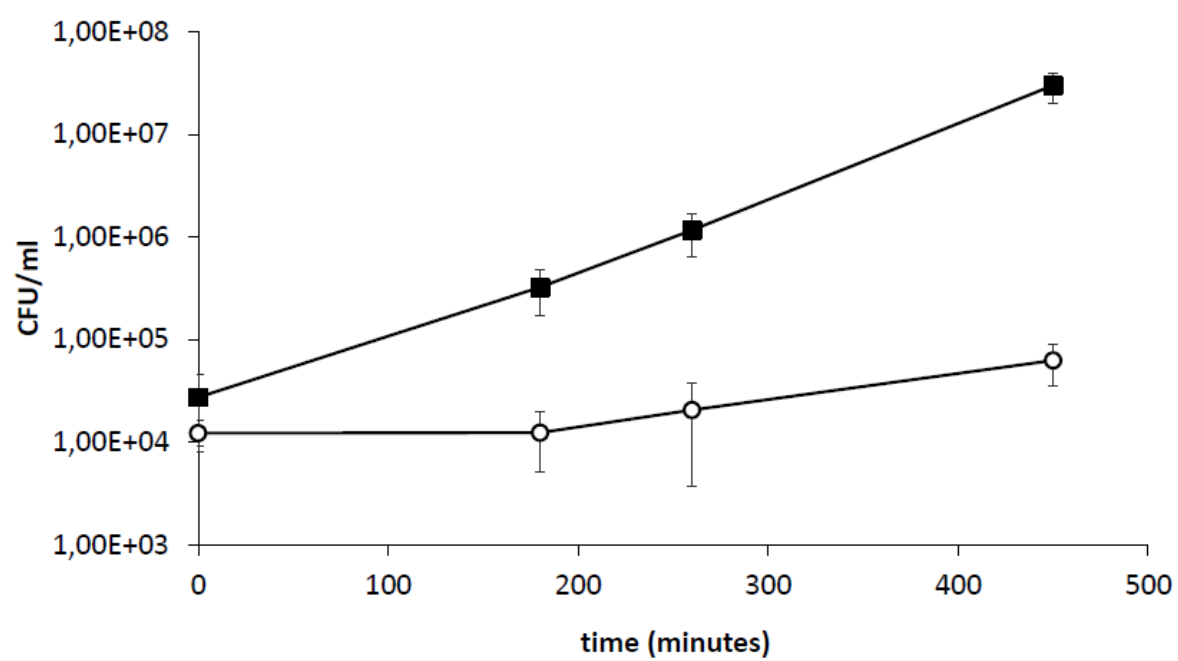


Figure 8



Supplementary Materials for

Expression profiling in a mammalian host reveals the strong induction of genes encoding LysM domain–containing proteins in *Enterococcus faecium*

Margherita Cacaci^{1,2#}, Caroline Giraud^{1#}, Loïc Léger¹, Riccardo Torelli², Cecilia Martini²,
Valentina Palmieri³, Brunella Posteraro⁴, Maurizio Sanguinetti^{2*}, Francesca Bugli^{2#}, and Axel
Hartke^{1#*}

¹ Normandie Univ, UNICAEN, U2RM–Stress and Virulence, 14000 Caen, France.

² Institute of Microbiology, Università Cattolica del Sacro Cuore, Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Rome, Italy.

³ Physics Institute, Università Cattolica del Sacro Cuore, 00168, Rome, Italy.

⁴ Institute of Public Health (Section of Hygiene), Università Cattolica del Sacro Cuore, Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Rome, Italy.

*Corresponding authors: axel.hartke@unicaen.fr; Maurizio.Sanguinetti@unicatt.it

These authors contributed equally to this work.

≠ These authors also contributed equally to this work.

Running title: *E. faecium* transcriptome in mice

Figure S1. Growth curves of *E. faecium* strains. Cells were grown in tubes in BHI without agitation at 37°C and growth was monitored at OD600. Filled circles: AUS0004; open triangles: triple mutant AUS0004 Δ 494 Δ 1059 Δ 1150 ; filled squares : AUS0004 Δ 1209. For clarity, only growth of the triple mutant is shown since growth of the single mutants AUS0004 Δ 494, AUS0004 Δ 1059 and AUS0004 Δ 1150 is similar to that of the triple mutant. Error bars denote standard deviation.

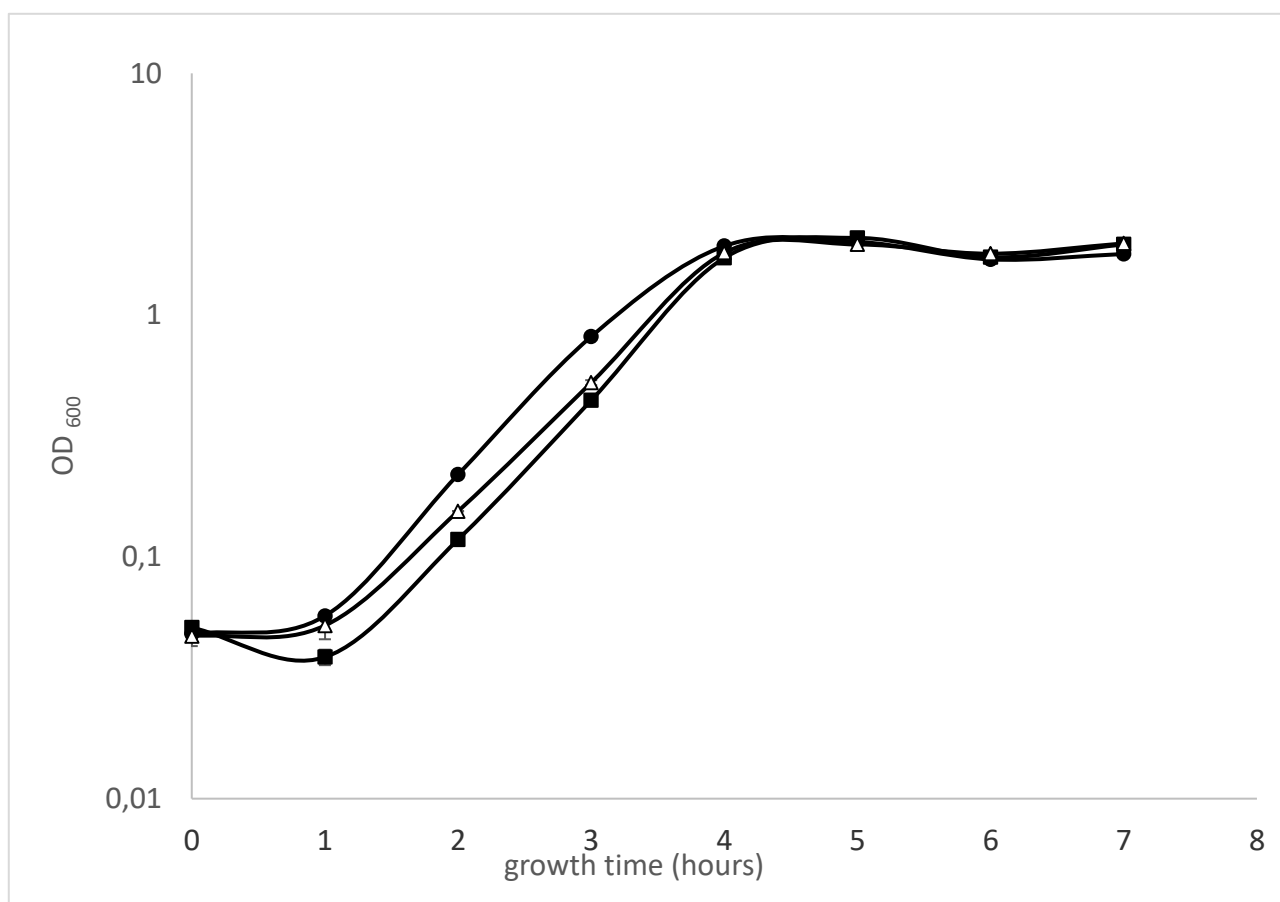


Figure S2. Sedimentation of bacterial cells. *E. faecium* cultures were incubated at 37°C for 24 hours without shaking. After shaking and OD600 measurement, the density appears to be comparable for each culture.

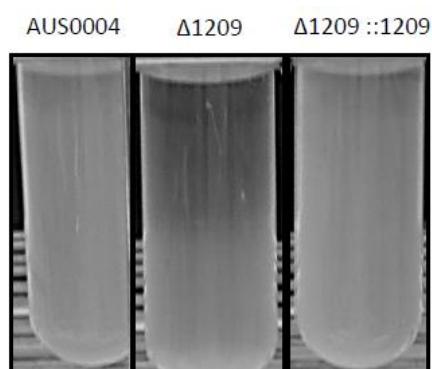


Figure S3. Western Blot with Anti-1209 polyclonal serum on whole cell lysates. M: Marker proteins; Lane 1: Aus0004; Lane 2: Δ 1209 mutant strain negative control. Lane 3: Δ 1059–1150–494 positive control.

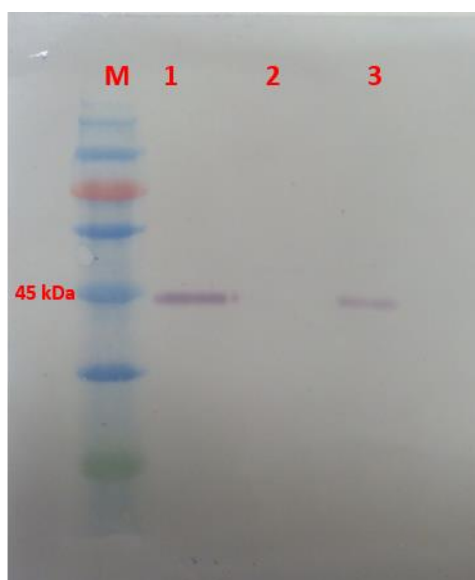


Figure S4. Growth in urine. Bacteria were inoculated in filtered urine and incubated 7.5 hours at 37°C and CFU/ml counts determined for the AUS0004 wild-type strain, the Δ 1209 mutant and the Δ 1209 ::1209 complemented mutant. Dark gray : CFU/ml counts at time 0 minutes ; light gray : CFU/ml counts at time 450 minutes. The assay was performed in duplicate. ns : not significant (p value = 0.15) ; *** : p value = 0.0009.

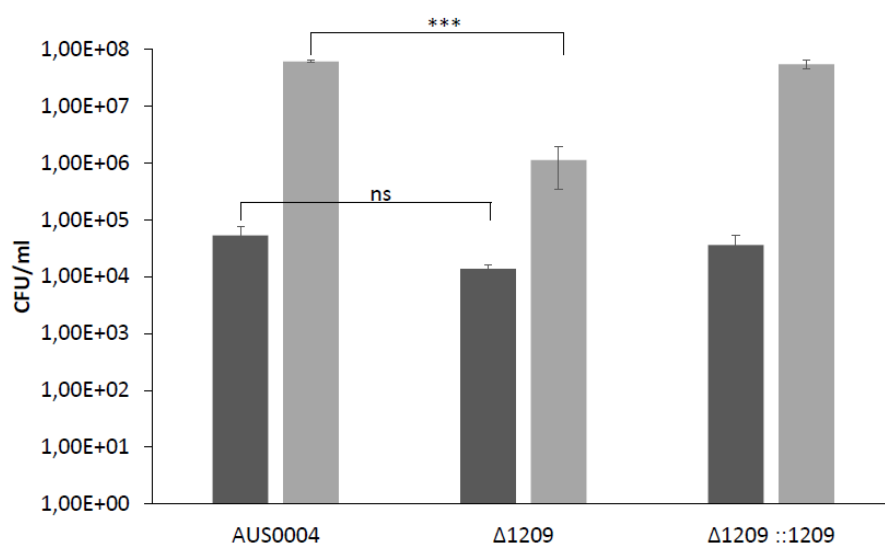


Table S1. Strains used in this study.

Strain	Description	Reference
AUS0004	<i>E. faecium</i> wild-type strain– bloodstream infection	[14]
Δ494	AUS0004 strain with full deletion of EFAU004_00494 gene	this work
Δ1059	AUS0004 strain with full deletion of EFAU004_01059 gene	this work
Δ1150	AUS0004 strain with full deletion of EFAU004_01150 gene	this work
Δ1209	AUS0004 strain with full deletion of EFAU004_01209 gene	this work
Δ1059–1150 double mutant	AUS0004 strain with full deletion of EFAU004_01059, EFAU004_01150 genes	this work
Δ1059–1150–494 triple mutant	AUS0004 strain with full deletion of EFAU004_01059, EFAU004_01150, EFAU004_00494 genes	this work
Δ1209 ::1209	AUS0004 strain with full deletion of EFAU004_01209 gene, complemented in <i>trans</i> on the chromosome	this work
<i>E. coli</i> Mach1–T1	PetSumo vector host	Thermo Fisher Scientific
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Expression of recombinant His–Tag protein	Thermo Fisher Scientific
<i>E. coli</i> EC1000	PwS3 vector host	[35]
JH2–2	<i>E. faecalis</i> wild-type strain	[29]
Δ1209:1209	Δ1209 strain with EFAU004_01209 region complemented	this work

Table S2. Plasmids used in this study.

Plasmid	Description	Reference
PWS3	Creation of deletion mutant in <i>E. faecium</i> AUS0004	[14]
PetSumo	Expression of recombinant His–Tag proteins	Thermo Fisher Scientific

Table S3. Primers used in this study.

PRIMER NAME	SEQUENCE 5'-3'	BP	TARGET	PURPOSE
ly494 fw1	GGGGGATCGATTACCATGATATACTCAGAG	30	upstream EFAU004_00494	deletion LysM 00494 in <i>E. faecium</i> AUS0004
ly494 fw2	CGCGAAGCTTCGTCTAGCTCCGC AAGTAGATACTGG	36	upstream EFAU004_00494	deletion LysM 00494 in <i>E. faecium</i> AUS0004
ly494 rv3	TATCGGCTTACATATTAACCTCT TTTTTCTCCG	35	upstream EFAU004_00494	deletion LysM 00494 in <i>E. faecium</i> AUS0004
ly494 fw4	GTTTAATATGTAAGCCGATAAAA GGAAATGATGAAACCG	40	downstream EFAU004_00494	deletion LysM 00494 in <i>E. faecium</i> AUS0004
ly494 rv5	CGCGGCGGCCGCGTACATGTCAC GCCACATTCTGAC	35	downstream EFAU004_00494	deletion LysM 00494 in <i>E. faecium</i> AUS0004
ly494 rv6	CCGCCCATTTCCGTTTCGTATATC TCC	27	downstream EFAU004_00494	deletion LysM 00494 in <i>E. faecium</i> AUS0004
1059 fw1	CTCCTCGAACTAATCAGTTTTCTA AAGGCTG	31	upstream EFAU004_01059	deletion LysM 01059 in <i>E. faecium</i> AUS0004
1059 fw2	CGCGCTCGAGGATGCTGCGGCTC TTGCATAATCATAGC	38	upstream EFAU004_01059	deletion LysM 01059 in <i>E. faecium</i> AUS0004
1059 fw4	ATTTTTCATGTAAGATTCATTATT TGAACGTTTAAACACA	40	downstream EFAU004_01059	deletion LysM 01059 in <i>E. faecium</i> AUS
01150 fw1	GAAGAACTCTGTTTTATCTTTTT GACTTTTTGTC	35	upstream EFAU004_01150	deletion LysM 01150 in <i>E. faecium</i> AUS0004
01550 fw2	CGCGGAATTCGCAGCAGTATAGA TTACTGTTGCTTCTTTA	40	upstream EFAU004_01150	deletion LysM 01150 in <i>E. faecium</i> AUS0004
01150 rv3	ATGAATCTTACATGAAAAATCTCC TTTATTCGTTAAAAAG	40	upstream EFAU004_01150	deletion LysM 01150 in <i>E. faecium</i> AUS0004
01150 fw4	ATTTTTCATGTAAGATTCATTAT TAATCAAACAGTTTAC	40	downstream EFAU004_01150	deletion LysM 01150 in <i>E. faecium</i> AUS0004
01550 rv5	CGGCGGCCGCGATTATCTGGATA TCTTTGGGTAAACGGC	40	downstream EFAU004_01150	deletion LysM 01150 in <i>E. faecium</i> AUS0004
01550 rv6	CCTTGGCTGAGCGTCTATCAAAA CGTTACG	30	downstream EFAU004_01150	deletion LysM 01150 in <i>E. faecium</i> AUS0004
1209 fw1	GCCCTCTTGAAATCTCTTCGAT ATCTTC	30	upstream EFAU004_01209	deletion LysM 01209 in <i>E. faecium</i> AUS0004
1209 fw2	CGCGACTAGTGCCGATCGTACTG ATAACGACTAAATCTAA	40	upstream EFAU004_01209	deletion LysM 01209 in <i>E. faecium</i> AUS0004
1209rv3	TAAAACAGTGTAATAATAGCCGC GCTTTGCGGCTTTTT	38	upstream EFAU004_01209	deletion LysM 01209 in <i>E. faecium</i> AUS0004
1209 fw4	GCTATTATTACACTGTTTACCTC CTAAACTCTATCGTG	39	downstream EFAU004_01209	deletion LysM 01209 in <i>E. faecium</i> AUS0004
01209rv 5	CGGCGGCCGCTTCGCAATCTGAA AGAAGATACGTCCTCCG	40	downstream EFAU004_01209	deletion LysM 01209 in <i>E. faecium</i> AUS0004
1209rv6	GGTCATCATCGTGTCACCGCTGC TTTCTC	29	downstream EFAU004_01209	deletion LysM 01209 in <i>E. faecium</i> AUS0004
1209A	TATTTAATTCTTAATTCTGACCAG GGT	28	EFAU004_012090 forward	expression of recombinant EFAU004_01209

1209B	GTGAGCAGAAAGATAGACATCA ATCTAC	29	EFAU004_012090 reverse	expression of recombinant EFAU004_01209
A1150	GCAATGTCTGTTCTTTTGTG	21	EFAU004_01150 upstream	sequencing control of deletion
B 1150	TTCACGTGTTAAAGTATTCCTCGT TGAAC	29	EFAU004_01150 upstream	sequencing control of deletion
C 1150	GTAGTCATCGGTACATTCTGTC	22	EFAU004_01150 downstream	sequencing control of deletion
A1059	TGTCCAGGGATGACATTGGCAAT C	22	EFAU004_01059 upstream	sequencing control of deletion
B 1059	GAGCGAACATCATTCTGTTAC	21	EFAU004_01059 upstream	sequencing control of deletion
C 1059	CATCGAGCGAACATCATTCTGTT AC	20	EFAU004_01059 downstream	sequencing control of deletion
OCG118	GCCGCTTGACGGATGTATTTCAA TCC	26	EFAU004-RS0793 Upstream	Complementation EFAU004_01209
OCG119	CGCGggtaccCTAAACCTTGAAA GCATATGGAG	34	EFAU004-RS0793 Upstream	Complementation EFAU004_01209
OCG120	GTACCGTTGCGCTTTATTCTATAT GTCATGAACAAGAG	38	EFAU004-RS0793 Downstream	Complementation EFAU004_01209
OCG121	AGAATAAAGCGCAACGGTACTTT TCCCAGA	30	EFAU004_01209 forward	Complementation EFAU004_01209
OCG122	AAGACAAAGCTCAAGAAATCGGT CGAGCAGG	31	EFAU004_01209 reverse	Complementation EFAU004_01209
OCG123	CGATTTCTTGAGCTTTGTCTTGTA AACTCCGTTT	34	EFAU004- RS15385 upstream	Complementation EFAU004_01209
OCG124	CGCGCCGCGGGCCATGCAGGAG GTAAGATATTA	33	EFAU004- RS15385 Upstream	Complementation EFAU004_01209
OCG125	TTTTGCAGATGGACAAGAAAAAC CC	25	EFAU004- RS15385 downstream	Complementation EFAU004_01209

Table S4. Common *in vivo* induced genes.log FC2: average log2 threshold of the over-expressed genes found in both the *in vivo* versus BHI exponential phase and *in vivo* versus BHI stationary phase analyses; pvalue: average of pvalue between the two analyses. The differentially expressed genes p-values are corrected for multiple testing error with a 5%false discovery rate. The correction used is Benjamini–Hochberg.

gene locus	description	logFC2	Pvalue
EFAU004_00021	ISL3 family transposase	2,98	2,29E–08
EFAU004_00022	DegV family protein	2,3	6,59E–05
EFAU004_00026	zinc transporter ZupT	1,31	1,06E–02
EFAU004_00073	GMP synthase	2,35	2,94E–04
EFAU004_00086	purine nucleoside phosphorylase	1,69	5,57E–03
EFAU004_00127	Bacterial membrane protein YfhO	2,02	1,69E–04
EFAU004_00140	chromosome partition protein SMC	2,25	3,60E–06
EFAU004_00141	HAD superfamily hydrolase	1,97	5,72E–05
EFAU004_00142	signal recognition particle–docking protein FtsY	2,94	7,31E–08
EFAU004_00148	iron ABC transporter substrate–binding protein	2,93	4,06E–05
EFAU004_00149	hypothetical protein	4,67	2,67E–09
EFAU004_00150	hypothetical protein	4,19	9,33E–08
EFAU004_00168	hypothetical protein	1,49	5,05E–03
EFAU004_00169	BioY family protein	2,48	3,28E–05
EFAU004_00174	calcineurin–like phosphoesterase	1,54	4,90E–03
EFAU004_00198	peptide deformylase	2,29	1,59E–05
EFAU004_00200	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	1,76	5,96E–03
EFAU004_00204	MATE efflux family protein	3,09	5,96E–03
EFAU004_00218	DEAD/DEAH box helicase	2,4	5,14E–04
EFAU004_00257	isopentenyl–diphosphate delta–isomerase	1,65	1,35E–03
EFAU004_00261	deoxynucleoside kinase	2	3,99E–05
EFAU004_00288	peptide methionine sulfoxide reductase	1,17	1,29E–02
EFAU004_00313	transporter, dicarboxylate/amino acid:cation symporter family protein	1,79	9,95E–07
EFAU004_00314	hypothetical protein	1,61	1,79E–03
EFAU004_00334	hypothetical protein	2,11	9,02E–03
EFAU004_00344	LysR family transcriptional regulator	2,84	1,49E–08
EFAU004_00391	hypothetical protein	2,5	1,95E–07
EFAU004_00399	TetR family transcriptional regulator	2,11	1,11E–02
EFAU004_00416	MerR family transcriptional regulator	1,81	1,31E–02
EFAU004_00426	sensor histidine kinase	1,98	3,38E–03
EFAU004_00434	hypothetical protein	4,75	1,14E–16
EFAU004_00435	ABC transporter ATP–binding protein	4,08	3,24E–15
EFAU004_00436	peptide ABC transporter permease/transmembrane protein	4,29	5,98E–14

EFAU004_00437	aldose 1–epimerase	3,42	7,33E–09
EFAU004_00438	aldose 1–epimerase	3,31	4,06E–10
EFAU004_00439	N–acetylmuramoyl–L–alanine amidase	2,11	9,68E–06
EFAU004_00449	periplasmic solute binding protein	5,43	4,70E–20
EFAU004_00457	ATP–dependent DNA helicase PcrA	2,16	6,11E–05
EFAU004_00468	dihydrodipicolinate synthase	1,54	8,51E–03
EFAU004_00489	ABC transporter ATP–binding protein	2,67	1,29E–02
EFAU004_00494	LysM domain–containing protein	3,96	6,58E–10
EFAU004_00503	pyridine nucleotide–disulfide oxidoreductase	1,51	5,29E–03
EFAU004_00528	tellurite resistance protein	3,04	6,53E–10
EFAU004_00529	5–bromo–4–chloroindolyl phosphate hydrolysis protein	1,95	6,27E–07
EFAU004_00530	nudix hydrolase, YffH family	1,73	7,51E–04
EFAU004_00532	5'–methylthioadenosine/S–adenosylhomocysteine nucleosidase	2,21	1,10E–02
EFAU004_00537	ribose–phosphate pyrophosphokinase	1,14	1,38E–02
EFAU004_00542	tRNA–specific 2–thiouridylase MnmA	1,75	3,73E–03
EFAU004_00544	aspartate aminotransferase	3,46	5,61E–05
EFAU004_00545	major facilitator superfamily transporter	3,17	1,84E–09
EFAU004_00548	DNA topoisomerase III	1,58	1,25E–03
EFAU004_00555	ArsC family protein	1,39	6,69E–03
EFAU004_00559	putative D–methionine–binding lipoprotein MetQ	2	8,97E–04
EFAU004_00562	cysteine desulfurase	1,34	8,97E–04
EFAU004_00563	NifU family SUF system FeS assembly protein	1,59	6,35E–03
EFAU004_00564	FeS assembly protein SufB	3,02	6,27E–08
EFAU004_00585	putative foldase protein PrsA	1,51	1,22E–02
EFAU004_00609	hypothetical protein	1,8	4,34E–04
EFAU004_00614	sulfatase	3,57	3,54E–10
EFAU004_00615	transcriptional activator Rgg/GadR/MutR	2,46	4,32E–03
EFAU004_00623	peptidase M20D	2,75	1,05E–03
EFAU004_00626	amino acid permease	7,58	1,32E–31
EFAU004_00633	N–acetylmuramic acid 6–phosphate etherase	1,6	8,74E–04
EFAU004_00634	PTS system, sugar–specific IIBC component	2,11	1,41E–05
EFAU004_00643	hypothetical protein	2,06	1,93E–04
EFAU004_00644	nicotinamide mononucleotide transporter PnuC	3,02	6,75E–06
EFAU004_00646	hypothetical protein	4,32	3,00E–15
EFAU004_00647	hypothetical protein	1,63	6,21E–04
EFAU004_00688	site–specific tyrosine recombinase XerC–family	1,53	3,76E–03
EFAU004_00691	MerR family transcriptional regulator	2,3	2,46E–05
EFAU004_00706	CarD family transcriptional regulator	1,43	1,15E–02
EFAU004_00717	DNA replication initiation control protein YabA	1,87	1,32E–04
EFAU004_00720	anaerobic ribonucleoside–triphosphate reductase activating protein	2,28	1,14E–03
EFAU004_00721	anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase	1,76	4,95E–03
EFAU004_00725	D–alanine–poly(phosphoribitol) ligase subunit 1	4,18	5,83E–15

EFAU004_00726	membrane bound O–acyl transferase	3,97	8,20E–15
EFAU004_00727	D–alanine—poly(phosphoribitol) ligase subunit 2	4,4	4,87E–16
EFAU004_00728	D–alanyl–lipoteichoic acid synthetase, DltD	4,81	8,92E–18
EFAU004_00770	cell division protein FtsA	1,55	1,04E–03
EFAU004_00771	cell division protein FtsZ	2,04	9,14E–04
EFAU004_00855	hypothetical protein	2,13	1,99E–04
EFAU004_00858	glutaminase	1,91	1,15E–02
EFAU004_00865	FtsW/RodA/SpoVE family cell cycle protein	2,47	1,61E–03
EFAU004_00866	cell envelope–related function transcriptional attenuator	4,84	8,09E–11
EFAU004_00870	penicillin binding protein transpeptidase domain protein	1,54	1,15E–02
EFAU004_00882	DNA–binding transcriptional repressor MarR	1,65	4,49E–04
EFAU004_00917	hypothetical protein	5,02	7,63E–20
EFAU004_00918	hypothetical protein	4,27	7,37E–14
EFAU004_00919	phosphomethylpyrimidine kinase	4,44	1,81E–15
EFAU004_00923	sensor histidine kinase	2,09	2,12E–05
EFAU004_00926	efflux ABC transporter permease	3,55	4,20E–03
EFAU004_00927	ABC transporter ATP–binding protein	2,45	3,70E–03
EFAU004_00932	LPXTG–motif protein cell wall anchor domain protein	1,3	1,37E–02
EFAU004_00940	alpha–L–rhamnosidase	1,93	1,24E–02
EFAU004_00950	3–demethylubiquinone–9 3–methyltransferase	2,83	3,55E–06
EFAU004_00951	transcriptional regulator, PSR protein	3,5	2,71E–10
EFAU004_00976	Formate—tetrahydrofolate ligase	2,69	1,48E–04
EFAU004_00990	hypothetical protein	2	5,24E–04
EFAU004_00994	cell division protein DivIVA	1,16	1,27E–02
EFAU004_00996	recombination protein U	3	2,19E–09
EFAU004_00997	penicillin–binding protein 1A	3,23	3,90E–08
EFAU004_00999	endonuclease III	2,19	1,00E–04
EFAU004_01019	Obg family GTPase CgtA	2,18	6,43E–03
EFAU004_01021	x–Pro dipeptidyl–peptidase	2,07	3,56E–04
EFAU004_01024	cyclophilin type peptidyl–prolyl cis–trans isomerase	3,32	3,56E–04
EFAU004_01045	amino acid/peptide transporter	3,97	2,07E–07
EFAU004_01059	peptidoglycan–binding protein LysM	9,23	3,75E–39
EFAU004_01074	ComE operon protein 2	2,04	9,28E–04
EFAU004_01104	Phosphoribosylamine—glycine ligase	6,33	1,27E–26
EFAU004_01105	bifunctional purine biosynthesis protein PurH	5,91	1,03E–22
EFAU004_01106	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	5,64	5,71E–21
EFAU004_01107	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo–ligase	5,58	3,80E–18
EFAU004_01108	Amidophosphoribosyltransferase	5,74	1,31E–19
EFAU004_01109	Phosphoribosylformylglycinamide synthase II	5,25	8,23E–19
EFAU004_01110	Phosphoribosylformylglycinamide synthase I	5,57	6,04E–15
EFAU004_01111	phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurS	3,53	4,74E–04

EFAU004_01112	Phosphoribosylaminoimidazole–succinocarboxamide synthase	4,65	2,56E–10
EFAU004_01115	Adenylosuccinate lyase	2,7	4,21E–03
EFAU004_01116	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, ATPase subunit	2,74	1,35E–04
EFAU004_01117	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit	4,77	1,35E–14
EFAU004_01118	xanthine permease	2,18	2,40E–04
EFAU004_01119	xanthine phosphoribosyltransferase	1,85	4,12E–03
EFAU004_01141	aminotransferase AlaT	2,02	2,26E–05
EFAU004_01150	LysM domain–containing protein	8,36	4,54E–35
EFAU004_01178	site–specific tyrosine recombinase XerC–family	1,34	5,93E–03
EFAU004_01186	signal peptidase I	1,44	8,33E–03
EFAU004_01188	methionine sulfoxide reductase MsrA	1,82	1,79E–04
EFAU004_01189	hypothetical protein	1,59	2,07E–03
EFAU004_01195	ABC transporter ATP–binding protein	2,08	2,55E–04
EFAU004_01209	LysM domain–containing protein	2,02	1,20E–04
EFAU004_01225	hypothetical protein	3,7	2,88E–11
EFAU004_01226	RNA polymerase sigma factor RpoD	1,69	9,21E–04
EFAU004_01228	cation transporter E1–E2 family ATPase	2,21	7,95E–04
EFAU004_01229	membrane protein	2,54	3,72E–06
EFAU004_01230	hypothetical protein	1,81	4,65E–03
EFAU004_01231	alpha/beta hydrolase	2,63	4,51E–07
EFAU004_01232	ysyl–tRNA synthetase	1,96	5,45E–03
EFAU004_01233	translation elongation factor Tu	1,45	4,19E–03
EFAU004_01239	acetyl–CoA	2,12	1,69E–04
EFAU004_01240	hydroxymethylglutaryl–CoA synthase	3,66	6,93E–12
EFAU004_01244	phosphomethylpyrimidine kinase	2,72	3,72E–08
EFAU004_01247	hypothetical protein	2,25	7,71E–05
EFAU004_01253	glyoxalase family protein	1,41	8,89E–03
EFAU004_01267	L–ribulose–5–phosphate 4–epimerase	3,42	2,35E–05
EFAU004_01269	3–keto–L–gulonate–6–phosphate decarboxylase	3,13	4,43E–04
EFAU004_01273	L–ascorbate 6–phosphate lactonase, UlaG	2,83	1,89E–04
EFAU004_01289	nucleic acid–binding protein	2,04	8,91E–04
EFAU004_01290	LysR family transcriptional regulator	3,3	3,48E–10
EFAU004_01296	xanthine/uracil/vitamin C permease	4,91	1,64E–13
EFAU004_01297	HAD superfamily hydrolase	2,99	1,14E–07
EFAU004_01299	Penicillin binding protein transpeptidase domain protein	4,17	1,26E–14
EFAU004_01325	MarR family transcriptional regulator	2,65	3,19E–04
EFAU004_01326	excinuclease ABC	2,24	7,42E–04
EFAU004_01337	hemolysin	2,22	6,35E–06
EFAU004_01343	23S rRNA (uracil–5–)–methyltransferase	2,21	9,46E–03
EFAU004_01346	transcriptional regulator	2,1	1,61E–05
EFAU004_01355	LuxR family DNA–binding response regulator	1,8	2,81E–03
EFAU004_01357	membrane protein	1,31	8,81E–03

EFAU004_01359	putative aminodeoxychorismate lyase	1,84	2,00E-04
EFAU004_01362	ISL3 family transposase	4,35	1,10E-04
EFAU004_01492	hypothetical protein	2,08	4,45E-05
EFAU004_01505	phosphosugar isomerase transcriptional regulator	2,37	6,08E-04
EFAU004_01586	LacI family transcriptional regulator	2,08	6,50E-07
EFAU004_01587	esterase	1,68	7,37E-04
EFAU004_01589	IS66 family transposase	1,67	1,11E-03
EFAU004_01601	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	1,94	8,94E-04
EFAU004_01603	Glycosyl hydrolases family 18	2,15	1,06E-04
EFAU004_01605	Prophage endopeptidase tail	1,66	1,04E-03
EFAU004_01606	Phage tail protein	2,43	3,53E-04
EFAU004_01607	Phage-related minor tail protein	1,63	1,11E-03
EFAU004_01608	hypothetical protein	2,52	3,38E-04
EFAU004_01609	phage major tail protein	1,99	6,41E-04
EFAU004_01610	hypothetical protein	1,97	5,77E-03
EFAU004_01611	phage protein, HK97 gp10 family	2,04	7,71E-03
EFAU004_01613	phage protein	2,56	6,99E-07
EFAU004_01614	major capsid protein	2,32	1,03E-05
EFAU004_01615	peptidase S14	2,33	2,37E-05
EFAU004_01616	Phage portal protein	1,79	4,71E-04
EFAU004_01617	phage terminase-like protein large subunit	1,39	4,71E-04
EFAU004_01628	hypothetical protein	3,38	1,79E-05
EFAU004_01630	phage-associated helicase	2,8	4,16E-05
EFAU004_01632	phage DNA polymerase	2,64	2,25E-05
EFAU004_01638	hypothetical protein	1,94	1,93E-03
EFAU004_01639	hypothetical protein	1,63	2,25E-05
EFAU004_01640	DNA polymerase I	3,14	4,45E-06
EFAU004_01642	hypothetical protein	2,1	1,72E-05
EFAU004_01643	hypothetical protein	2,29	5,22E-06
EFAU004_01644	Glyoxalase-like domain protein	1,34	1,10E-02
EFAU004_01645	hypothetical protein	1,54	4,72E-03
EFAU004_01646	hypothetical protein	2,09	3,65E-04
EFAU004_01647	Eco29kl restriction endonuclease	2,48	1,95E-05
EFAU004_01648	Site-specific DNA methylase	2,23	1,31E-04
EFAU004_01672	phosphoglucosamine mutase	1,7	2,12E-03
EFAU004_01704	L,D-carboxypeptidase A	1,45	1,85E-04
EFAU004_01729	arginine repressor protein	2,59	4,41E-07
EFAU004_01751	peptidase, S54 family protein	1,23	1,63E-02
EFAU004_01753	ferrichrome transport system permease FhuG	1,36	6,37E-03
EFAU004_01754	ferrichrome transport system permease FhuB	1,59	1,30E-02
EFAU004_01756	periplasmic binding protein	4,03	3,65E-14
EFAU004_01773	hypothetical protein	2,33	6,98E-05
EFAU004_01774	glycerophosphodiester phosphodiesterase family protein	2,88	3,39E-07
EFAU004_01779	ISEfm1, transposase	5,76	7,30E-08

EFAU004_01789	sulfatase	2	1,98E-04
EFAU004_01790	hypothetical protein	1,4	7,86E-04
EFAU004_01791	hypothetical protein	1,86	3,24E-04
EFAU004_01838	glycoside hydrolase, family 32	1,75	3,09E-03
EFAU004_01867	cell wall surface anchor family protein	2,89	8,94E-04
EFAU004_01870	tRNA (guanine-N1)-methyltransferase	1,22	8,35E-03
EFAU004_01878	signal recognition particle protein	2,22	5,17E-03
EFAU004_01882	sensory box histidine kinase	1,67	6,66E-03
EFAU004_01883	cation transporter E1-E2 family ATPase	4,1	2,86E-15
EFAU004_01886	phosphate-binding protein	3,78	2,87E-06
EFAU004_01891	ISL3 family transposase	1,48	2,85E-03
EFAU004_01906	hypothetical protein	2,48	6,94E-07
EFAU004_01921	cadmium-translocating P-type ATPase	4,75	3,28E-13
EFAU004_01925	asparaginyl-tRNA synthetase	2,13	7,12E-03
EFAU004_01926	aspartate aminotransferase	1,71	2,82E+00
EFAU004_01927	hypothetical protein	1,5	2,25E-03
EFAU004_01928	DnaQ family exonuclease/DinG family helicase	1,69	7,97E-04
EFAU004_01933	hypothetical protein	2,82	1,04E-03
EFAU004_01934	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	3,52	4,15E-11
EFAU004_01937	fibronectin-binding protein	2,98	8,29E-11
EFAU004_01938	HD domain-containing protein	3,7	4,79E-07
EFAU004_01941	putative OxaA-like protein	2,78	5,04E-04
EFAU004_02004	6-phospho-beta-glucosidase	2,1	3,81E-05
EFAU004_02010	ABC transporter ATP-binding protein	1,84	4,65E-04
EFAU004_02016	glycosyl transferase family protein	2,59	3,00E-07
EFAU004_02018	Xaa-Pro dipeptidase	3,06	3,91E-05
EFAU004_02025	hypothetical protein	3,24	1,10E-08
EFAU004_02026	PspC domain-containing protein	2,41	2,36E-09
EFAU004_02027	hypothetical protein	3,31	2,50E-07
EFAU004_02037	efflux ABC transporter permease	2,78	4,82E-05
EFAU004_02040	Preprotein translocase subunit SecA	1,88	2,28E-03
EFAU004_02046	hypothetical protein	1,33	5,52E-03
EFAU004_02077	SorC family transcriptional regulator	3,14	8,38E-13
EFAU004_02082	DNA-directed RNA polymerase subunit delta	1,58	3,80E-03
EFAU004_02092	V-type sodium ATP synthase subunit J	2,12	1,44E-05
EFAU004_02093	V-type ATP synthase subunit D	1,57	8,63E-04
EFAU004_02094	V-type ATP synthase subunit B	1,73	7,31E-04
EFAU004_02108	recombination and DNA strand exchange inhibitor protein	1,55	3,13E-03
EFAU004_02155	hypothetical protein	1,6	1,01E-02
EFAU004_02157	hypothetical protein	1,8	1,52E+00
EFAU004_02193	Carbonic anhydrase/acetyltransferase	1,68	5,69E-04
EFAU004_02198	Ribonuclease J 1	2,15	5,99E-06
EFAU004_02232	cytidine/deoxycytidylate deaminase family protein	1,81	8,38E-04
EFAU004_02235	rRNA (cytosine-C(5)-)-methyltransferase	2,28	3,26E-05

EFAU004_02244	Ribonuclease J 2	1,5	6,31E-03
EFAU004_02251	hypothetical protein	1,21	1,95E+00
EFAU004_02253	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	1,84	2,37E-04
EFAU004_02272	hypothetical protein	2,51	3,87E-03
EFAU004_02276	IS200/IS605 family transposase	5,42	1,48E-21
EFAU004_02277	ABC transporter ATP-binding protein	6,42	7,42E-26
EFAU004_02278	ABC transporter ATP-binding protein	7,24	1,24E-28
EFAU004_02279	oligopeptide ABC transporter, permease protein OppC family protein	6,72	4,73E-27
EFAU004_02280	oligopeptide ABC superfamily ATP binding cassette transporter	6,45	4,98E-22
EFAU004_02281	hypothetical protein	2,43	1,47E-05
EFAU004_02282	oligopeptide ABC superfamily ATP binding cassette transporter	7,07	2,39E-27
EFAU004_02284	glycerol dehydrogenase	6,9	3,13E-30
EFAU004_02285	ribosomal RNA large subunit methyltransferase N	3,62	5,87E-07
EFAU004_02286	cell division protein FtsK	2,29	5,46E-05
EFAU004_02292	Collagen-binding protein	2,56	4,88E-03
EFAU004_02306	acetyltransferase	2,49	2,54E-03
EFAU004_02308	signal peptidase I	3,38	8,76E-11
EFAU004_02309	hypothetical protein	2,28	2,94E-03
EFAU004_02310	hypothetical protein	2,9	6,56E-04
EFAU004_02314	CobB/CobQ-like glutamine amidotransferase domain protein	1,26	6,91E-03
EFAU004_02433	Substrate binding domain of ABC-type glycine betaine transport system	3,57	3,04E-08
EFAU004_02434	glycine betaine transporter ATP-binding subunit	4,71	3,76E+00
EFAU004_02454	L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent subunit alpha	2,13	1,93E-08
EFAU004_02456	hypothetical protein	1,65	8,73E-05
EFAU004_02486	HAD superfamily hydrolase	2,37	1,52E-04
EFAU004_02490	acyltransferase	2,44	1,10E-05
EFAU004_02491	methyltransferase small domain-containing protein	1,83	2,90E-04
EFAU004_02493	acyltransferase	3,31	1,83E-06
EFAU004_02509	ABC transporter ATP-binding protein	3,45	2,46E-11
EFAU004_02519	adenine deaminase	3,52	2,36E-08
EFAU004_02548	glucuronate isomerase	1,23	1,04E-02
EFAU004_02552	hypothetical protein	3,69	1,27E-12
EFAU004_02553	penicillin-binding protein	4,66	2,59E-17
EFAU004_02554	23S rRNA pseudouridine synthase D	1,61	3,80E-03
EFAU004_02590	TetR family transcriptional regulator	1,41	4,82E-03
EFAU004_02598	chaperonin HsLO	1,22	1,27E-02
EFAU004_02599	ATP-dependent metalloprotease	1,42	7,13E-03
EFAU004_02600	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	1,43	3,99E-03
EFAU004_02609	ErfK/YbiS/YcfS/YnhG family protein	2,53	1,22E-06
EFAU004_02613	NlpC/P60 family lipoprotein	5	9,13E-19

EFAU004_02618	serine/threonine–protein kinase	2,65	5,88E–05
EFAU004_02619	serine/threonine phosphatase	1,71	9,70E–03
EFAU004_02620	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase B	1,87	3,32E–03
EFAU004_02621	Methionyl–tRNA formyltransferase	1,75	9,11E–03
EFAU004_02622	Peptide deformylase	1,55	7,95E–03
EFAU004_02623	Primosomal protein N'	1,52	2,22E–03
EFAU004_02624	DNA–directed RNA polymerase subunit omega	1,39	4,60E–03
EFAU004_02635	ABC transporter permease	5,52	8,75E–17
EFAU004_02636	ABC transporter ATP–binding protein	5,68	2,77E–20
EFAU004_02637	periplasmic solute binding family protein	5,31	7,15E–20
EFAU004_02641	2',3'–cyclic–nucleotide 2'–phosphodiesterase	1,58	1,50E–03
EFAU004_02645	hypothetical protein	3,21	3,49E–12
EFAU004_02649	GNAT family acetyltransferase	1,92	6,19E–04
EFAU004_02663	gamma–glutamyl phosphate reductase	1,61	1,54E–03
EFAU004_02665	hypothetical protein	1,25	8,79E–03
EFAU004_02691	ABC transporter ATP–binding protein	1,69	3,89E–03
EFAU004_02694	sensor histidine kinase	1,82	3,69E–04
EFAU004_02695	response regulator receiver domain–containing protein	1,95	3,36E–04
EFAU004_02696	ABC–2 family transporter protein	1,99	1,91E–04
EFAU004_02697	bacitracin transport ATP–binding protein BcrA	1,67	3,69E–04
EFAU004_02759	CobW/P47K family protein	1,34	1,03E–02
EFAU004_02762	periplasmic solute binding family protein	1,3	1,90E–03
EFAU004_02768	30S ribosomal protein S14	1,75	4,77E–03
EFAU004_02774	D–alanyl–D–alanine dipeptidase	4,16	2,25E–17
EFAU004_02775	D–alanine—D–lactate ligase	4,28	3,86E–12
EFAU004_02776	VanH protein, D–specific alpha–keto acid dehydrogenase	3,75	2,46E–08
EFAU004_02777	vancomycin B–type resistance protein VanW	4,74	2,95E–12
EFAU004_02778	VanY protein, D–alanyl–D–alanine carboxypeptidase	4,51	7,42E–11
EFAU004_02779	sensor histidine kinase VanSB	1,95	6,33E–05
EFAU004_02786	Helix–turn–helix domain protein	2,65	3,82E–11
EFAU004_02798	TraG/TraD family protein	2,17	4,33E–03
EFAU004_02799	hypothetical protein	5,72	2,63E–04
EFAU004_02800	hypothetical protein	6,58	5,00E–07
EFAU004_02801	hypothetical protein	8,46	1,15E–11
EFAU004_02802	ABC transporter ATP–binding protein	4,06	1,59E–13
EFAU004_02803	hypothetical protein	4,65	8,03E–12
EFAU004_02804	ABC transporter ATP–binding protein	3,48	2,01E–06
EFAU004_02805	Cobalt transport protein	3,46	1,75E–03
EFAU004_02807	hypothetical protein	2,98	1,70E–03
EFAU004_02808	iron dependent repressor, DNA binding domain protein	3,75	3,33E–09
EFAU004_02809	adhesion lipoprotein	5,06	1,24E–17
EFAU004_02810	metal ion ABC transporter permease	3,1	1,83E–04

EFAU004_02812	ABC transporter ATP-binding protein	3,08	1,83E-04
EFAU004_02814	30S ribosomal protein S9	3,03	3,07E-05
EFAU004_02838	cell wall surface adhesion protein	3,48	6,32E-11
EFAU004_02855	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	2,24	3,74E-03
EFAU004_02859	sporulation initiation inhibitor protein Soj	1,75	2,33E-04
EFAU004_02860	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase G	1,64	3,58E-03
EFAU004_02872	16S ribosomal RNA	2,75	9,62E-01
EFAU004_02887	tRNA	6,7	3,14E-20
EFAU004_02902	tRNA	1,42	7,47E-03
EFAU004_02912	tRNA	6,28	7,58E-14
EFAU004_03017	tRNA	6,18	7,67E-21
EFAU004_03037	tRNA	3,51	1,05E-09
EFAU004_03042	tRNA	4,95	3,63E-06
EFAU004_03047	tRNA	6,98	1,64E-20
EFAU004_03052	tRNA	5,8	4,62E-15
EFAU004_03057	tRNA	7	8,46E-22
EFAU004_03077	tRNA	5,31	7,18E-10
EFAU004_03087	tRNA	2,49	5,73E-03
EFAU004_03172	tRNA	3,26	4,29E-09
EFAU004_p1002	regulatory protein TraE1	1,99	9,45E-03
EFAU004_p1009	sortase family protein	2,48	3,93E-06
EFAU004_p1010	cell wall surface anchor family protein	2,54	4,04E-06
EFAU004_p1011	sortase family protein	2,24	2,80E-05
EFAU004_p1012	hypothetical protein	1,69	1,16E-05
EFAU004_p1013	hypothetical protein	2,65	2,02E-06
EFAU004_p1018	hypothetical protein	2,41	1,15E-03
EFAU004_p1019	hypothetical protein	1,86	1,34E-03
EFAU004_p1025	ATPase	2,07	3,93E-05
EFAU004_p1033	hypothetical protein	1,97	3,77E-03
EFAU004_p1038	DNA topoisomerase III	2,99	1,72E-05
EFAU004_p1042	single-strand binding protein	2,86	9,03E-09
EFAU004_p1045	hypothetical protein	4,25	1,39E-08
EFAU004_p1058	ImpB/MucB/SamB family protein	2,68	6,56E-04
EFAU004_p1061	replication control protein PrgN	2,04	8,86E-03

Table S5. Count per million reads (cpm) normalized according to the library seize. The genes having a count above 1 cpm were kept for calculating the average cpm.

gene locus	experimental condition		
	BHI exponential phase	BHI stationary phase	in vivo
EFAU004_00494	21,8289908	83,4935513	666,521862
EFAU004_01059	5,38402678	24,0568395	6784,84111
EFAU004_01150	6,04835011	20,3718175	3670,74163
EFAU004_01209	151,885301	228,069084	750,545624
average cpm for all genes	415,84014	327,96218	411,122148

Résumé. Les β -lactamines stimulent une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène chez *Enterococcus faecalis* : un facteur de risque pour le cancer colorectal.

L'argument selon lequel les antibiotiques bactéricides stimulent la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *reactive oxygen species*) chez certaines bactéries en augmentant leur activité respiratoire est sujet à discussions. *Enterococcus faecalis* a des propriétés intéressantes pour tester cette hypothèse. La respiration ne s'observe qu'en présence d'hème ou de fumarate. En l'absence d'hème, *E. faecalis* produit du superoxyde extracellulaire par l'autoxydation d'une demethylmenaquinone (DMK), un composant de sa chaîne respiratoire associé à sa membrane. En raison de cette propriété, *E. faecalis* est soupçonné de jouer un rôle dans la cancérogenèse colorectale. Nous montrons dans cette étude que les β -lactamines amplifient significativement la production de ROS. Cette augmentation, dépendante de DMK, n'est observée qu'en l'absence de respiration. Nos résultats pourraient également fournir une explication quant au risque accru de cancer colorectal observé chez des patients traités par des β -lactamines, comme le montrent de récentes études cliniques.

Mots clés : *Enterococcus faecalis*, stress oxydatif, β -lactamine, cancer colorectal.

Abstract. β -Lactams Might Increase the Risk of Cancer by Boosting ROS Formation in *Enterococcus faecalis*.

The proposal that bactericidal antibiotics stimulate the formation of reactive oxygen species (ROS) by increasing respiration is still a matter of debate. *Enterococcus faecalis* has interesting properties to test this hypothesis. Respiration occurs only in the presence of heme or fumarate. In the absence of heme, *E. faecalis* produces extracellular superoxide through autoxidation of demethylmenaquinone (DMK), a component of its respiratory chain. Due to this ability, *E. faecalis* is suspected to play a role in colorectal carcinogenesis. We show in this study that β -lactam antibiotics increase significantly the production of ROS. This boost of ROS formation is DMK-dependent and only observed in the absence of respiration. Our results could provide a mechanistic explanation for the observed increased risk of colorectal cancer by β -lactam antibiotics in several recent nested case-control studies.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, oxidative stress, colorectal cancer

Discipline : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Normandie Univ, UNICAEN, Unité de Recherche Risques Microbiens, 14000 Caen, France