HAL
open science

Analyse de la réponse physiologique et génétique de Pseudomonas aeruginosa et Enterococcus faecalis envers l'épinéphine et recherche de senseurs putatifs.

Melyssa Cambronel

To cite this version:

Melyssa Cambronel. Analyse de la réponse physiologique et génétique de Pseudomonas aeruginosa et Enterococcus faecalis envers l'épinéphine et recherche de senseurs putatifs.. Bactériologie. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMR106 . tel-03491861

HAL Id: tel-03491861

https://theses.hal.science/tel-03491861

Submitted on 18 Dec 2021

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

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Analyse de la réponse physiologique et génétique de *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis* envers l'épinéphrine, et recherche de senseurs putatifs

Présentée et soutenue par
Mélyssa CAMBRONEL

Thèse soutenue publiquement le 17 décembre 2019 devant le jury composé de		
Madame Sylvie ELSEN	CR / CNRS Grenoble	Rapporteur
Madame Nalini RAMA RAO	DR / INRA Jouy-en-Josas	Rapporteur
Monsieur Djamel DRIDER	PU / Université de Lille-1	Examinateur
Monsieur Olivier LESOUHAITIER	PU / Université de Rouen Normandie	Examinateur
Monsieur Marc FEUILLOLEY	PU / Université de Rouen Normandie	Examinateur
Madame Nathalie CONNIL	MCF / Université de Rouen Normandie	Directrice de thèse

Thèse dirigée par le Dr Nathalie CONNIL, Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement EA4312

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

LMSM

À mon amour et ma famille

Remerciements

Après cinq années passées au laboratoire (Master et Thèse), un chapitre se termine, un nouveau commence. Avant de tourner la page pour le prochain chapitre, je tiens à remercier de façon particulière tout ceux qui ont fait de ces 5 années un moment particulier, que ce soit au niveau professionnel que personnel. Parce qu'on le sait tous, une thèse ce n'est pas toujours facile et c'est grâce à vous qui aurez votre nom dans cette page spéciale, que cela a été possible !! Il y a eu tellement de beaux et bons souvenirs que je pourrais en écrire un livre, mais bon après ce manuscrit, je vais peut-être attendre un peu… !

Tout d'abord, je tiens à remercier **Marc Feuilloley**, directeur du laboratoire, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et pour m'avoir fait confiance toutes ces années. Merci aussi pour tes anecdotes en tout genre et pour ces petits moments pauses en fin de journée, à nous raconter tes bons souvenirs de jeunesse !

Un merci particulier aux membres du jury ! Je sais bien que cela n'est pas facile de trouver du temps pendant cette période de fin d'année, alors un grand merci à vous tous : **Sylvie Elsen**, **Nalini Rama Rao**, **Djamel Drider**, **Olivier Lesouhaitier**, **Marc Feuilloley** et **Nathalie Connil**. Merci d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et merci pour votre disponibilité.

Nathalie, merci de m'avoir acceptée depuis ce premier stage en Master 2 et de m'avoir fait confiance ! Merci de m'avoir donné la chance et l'opportunité de réaliser cette thèse, ça n'a pas toujours été facile, mais on y est arrivé ! Et merci pour ces petites histoires sur tes péripéties en tout genre et surtout celles pour aller à certains congrès…!

Merci à tous ceux qui ont permis de réaliser les différentes analyses nécessaires pour mes travaux de thèse et ont donc participé au bon déroulement de celle-ci : **Julie Hardouin** pour la protéomique, **Isabelle Rincé** et **Cécile Muller** pour les expériences sur *Galleria Mellonella*, et merci à **Laure Taupin** et **Karine Réhel** pour les analyses rhamnolipides, ainsi qu'à **Aurélie Crabbé** pour les mutants de *P. aeruginosa* et **Pierre Cornelis** pour ses conseils !

Merci à toi **Sylvie** pour ta bonne humeur en toute circonstance et ton rire qu'on peut entendre jusqu'à l'autre bout du couloir, ça fait toujours plaisir ! Je n'oublierai pas ces pauses

impromptues à la fin de tes cours dans le bureau, une pomme à la main… Et le café dans l'autre !

Emeline, merci à toi pour tous les conseils que tu as pu me donner et pour ta disponibilité, mais aussi pour ton savoir-faire en biomol !! J'aurai une pensée particulière pour toi quand j'aurai les résultats du RNAseq !!

Et là, je pense aussi à **Oliver** dit Mailloli et je me dis « Oh Maillot si tu savais… tout le bien que j'pense de toi !! » (Heureusement que je ne chante pas réellement ça serait un désastre… !). Sincèrement un très grand merci à toi, il y a tellement de choses qui ne seraient pas possibles sans toi au labo !! Toujours prêt à te stopper dans tes manips pour rendre service ! Bon en revanche ton rap ne va pas me manquer hein… « *Hush hush* » ou « *elle fait la go* » ce genre de musique qui reste bien dans la tête… Mais ton humour et toutes les âneries que tu as pu sortir, je m'en souviendrai, je dois même avoir des petites photos dossiers…. Promis ça n'ira pas sur ta page Facebook !

Toutes ces années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans vous tous, collègues doctorants !! Parce qu'en 5 ans au laboratoire, on en voit passer des gens…

Mon cher **Mathias**, alias *pulguito feo* ! Qu'est-ce qu'on a pu se marrer au labo et je ne parle pas de toutes les bêtises que tu as pu faire hein… Je dois avoir des centaines de preuves… Quand je revois cette pub « Mikit » ou encore « Stana » je suis morte de rire, tout comme cette cocotte moineau, je ne verrai plus Le Roi Lion de la même façon, je crois !! Merci encore pour tous ces moments, les apéros chez toi et ces bons camemberts au four (rien que d'en parler, j'ai faim…). Maintenant quand je vois des buffets à volonté je pense à toi (et Thotho…) Merci pour ta gentillesse et ton humour !! Une autre personne partie et qui m'a en partie encadrée lors de mon premier stage au laboratoire, **Thomas** ! Je n'oublierai pas ce moonwalk que tu as pu nous faire ni le bruit du pigeon que tu imites si bien… oups…. Fallait pas le dire ? Merci pour ce rire diabolique que tu as pu avoir et pour avoir écrasé le panier à linge !! Et pour tous ces échanges sur les séries TV, hâte de pouvoir discuter de la nouvelle saison de Lucifer et de toutes les autres en fait et puis maintenant j'ai hâte de t'entendre jouer du ukulélé… Merci à toi **Ségogo** avec tes « Wololo » !!! On s'est quand même bien marré !! A toi **Valou**, ça fait toujours du bien de parler des manips quand ça ne va pas, ces petites sessions psy m'ont bien faite rire !

Et puis, il y a ceux qui vont bientôt finir, ceux en plein dedans et ceux qui viennent de commencer…

Merci à toi **Djoudjou**, d'avoir contribué à cette jolie petite liste de perles ahah je te souhaite bon courage pour ta thèse, tu vas y arriver t'en fait pas !! **Maxou** et **Mathilde**, parce que l'un ne va jamais sans l'autre… « hey t'as pas vu Boutbout ? » ah ce moment d'anthologie, jusqu'à aller en chambre froide quand même ! Y a eu tellement de fous rires… Je repense à ce gif de dauphin là, garde ce grain de folie Maxou (mais pas trop quand même hein, après ça devient inquiétant !) Mathilde bon courage pour cette fin de thèse, je ne m'en fais pas pour toi, tu vas assurer !!! Mister **Xavier**, le monsieur geek avec qui je peux parler de jeux vidéo et surtout de WonderWoman !!! Prends date, le prochain c'est pour 2020 ! Merci à toi et prends soin de ta petite famille. Merci à **Cecil** pour m'avoir permis de développer mon anglais et à toi **Thibault**, j'ai enfin pu gagner une partie de Perudo… Bon courage à vous deux ! Aux petits nouveaux, **Audrey** alias DéDé et **Yvann** alias Monsieur le coach sportif ! Quel plaisir de bosser avec vous ! Audrey n'oublie pas de souffler et de te détendre, va courir avec Choupette et défends-toi quand je ne serais plus dans le bureau hein, faut pas se laisser faire voyons, le chauffage, c'est la vie ! Yvann on se retrouve bientôt à la salle de sport ! Merci pour tous ces petits moments (et les gâteaux Bretons !) et pour les mojitos (à refaire rapidement d'ailleurs…) !

Et il y a les autres…

Mélissande bon courage à toi et prends bien soin de nos enfants les pti vers ! **Coco** toujours disponible, merci à toi pour toute l'aide que tu as pu m'apporter et pour ta gentillesse ! Je serai toujours disponible pour arroser tes plantes l'été ! Une pensée pour mes stagiaires que j'ai eu le plaisir d'encadrer, qui ont été formidables et qui me manquent : ma petite **Minimoyz** (va falloir qu'on se revoie vite !!!), et aux gars **Jérôme** et **Florian** pour leur travail et leur bonne humeur au quotidien. Merci aussi à **Chloé** et **Malvina** !

Un grand merci à toi Señor **Ali**, fan du Barça (je ne pense pas que l'on puisse l'oublier) !! Toutes ces petites conversations dans le labo vont me manquer, tes cours d'espagnol (que je n'ai pas dû retenir…) ta gentillesse et tes conseils scientifiques, mais aussi tous les mots à moitiés français que tu as pu nous sortir, le « très cookie » fait partie de mes préférés. Y en a eu pleins d'autres, mais je les garde précieusement dans ma superbe liste !

Qu'aurait été ma thèse sans toi cher binôme ?? Je ne sais par où commencer, parce qu'un simple merci ne suffirait pas. C'est une de ces belles rencontres que l'on fait dans la vie ! Y a eu tellement de bons moments que j'en oublie sûrement ! Toutes ces manips de croissances qui nous ont presque rendues folles, heureusement y avait la voix de Bradley pas loin… Et non, nous ne sommes pas lentes pendant les manips on prend juste le temps (et on parle beaucoup aussi, et pas que de Bradley…) A toutes ces discussions le vendredi soir dans la salle biomol, à ce binôme de « ménache » super efficace ! Pour tous ces fous rires, les raclettes, tes conseils, ce fou rire sur le duplex et ton aide durant cette dernière année de thèse mais aussi pour la rédaction de ce manuscrit un énorme MERCI **Madame Fofy le T-Rex** (t'as vu, j'ai mis de la couleur rien que pour toi et même que c'est du rose…)!!!

Merci à tous les autres membres du laboratoire, **Amine** pour ton aide avec le séquençage et la bio-informatique, **Pierre-Jean** pour ton aide sur le docking et merci aux autres **Andréa**, **Xavier**, **Annabelle**, **Anne**, **Cécile**, **Magalie** et **Chloé** et à tous ceux que j'aurai oublié !

Parce que la thèse ce n'est pas que le boulot, je voudrais remercier les amis, ma ptite **Emma**, ce n'est pas toujours facile de se voir avec nos emplois du temps, mais on y arrive quand même ! **Alex**, promis dès que je finis la thèse, je lis et corrige ton début de livre !! A **Floflo** et mon **gros Josh**, je vous jure on va enfin pouvoir se voir après si longtemps et on pourrait même manger une superbe raclette (quelle bonne idée j'ai eu, va falloir programmer ça tout de suite) !! Et Flo je n'oublie pas les vacances qu'on doit se faire au Sri Lanka hein !

Et parce que la famille, il n'y a rien de plus important, merci à toi ma ptite **Maman** d'avoir toujours été là pour moi et d'avoir cru en moi depuis toujours (et d'avoir relu tout le manuscrit de thèse !!!), mes sista d'amour ma **Yuyu** et ma **Doudou** (Bob ou autre surnom possible, je ne vais tout de même pas tous les citer ahah), maintenant que ça se termine promis, on est dispo pour les sorties (et le sport…) !! A **mes frères**, à **Nonore** et **mon pti bouchon** ! J'ai hâte de vous revoir ! Je pense aussi à tous ces vendredis soir à la maison et remercie **Thierry** pour ses blagues et jeux de mots qui me vendent du rêve ainsi que le pti dernier **Tim** pour nous faire bien rire et nous faire penser à autres choses que le boulot. Merci **Brigitte** et **Martial**, vous êtes adorables, merci pour tous les petits plats ramenés le dimanche… Oh merci à **Bernard**

aussi pour les bons légumes du jardin, ça fait toujours du bien au moral et merci au reste de la belle famille !

J'allais oublier, j'avais promis de le faire, merci à **ma bête** d'avoir rédigé 100 pages de charabia, tu as bien contribué à la rédaction cet été… J'apprendrais dorénavant à enregistrer un document avant de laisser le chat monter sur le pc !

Comme on dit : le meilleur pour la fin. Merci à **mon homme** (j'aurai pu utiliser d'autres noms, mais je suis restée soft t'as vu ?) d'avoir été là à tous les moments de cette thèse et plus encore… Merci d'avoir été là depuis le début de notre rencontre, tu m'as tant apporté… Merci de m'avoir supporté jusqu'ici, ce n'est pas toujours facile, surtout quand je suis fatiguée… On se l'était dit, si on survit à la thèse, on peut survivre à tout ! Alors à nous la vie maintenant !!

INTRODUCTION **9**

I. Pathogènes opportunistes *11*
A. *Pseudomonas aeruginosa* 13
1. Virulence de type aiguë 14
2. Virulence de type chronique : le biofilm 17
3. *Quorum-sensing* chez *P. aeruginosa* 21
4. Systèmes à deux composants 24
5. Homéostasie du fer chez *P. aeruginosa* 27
B. *Enterococcus faecalis* 33
1. Facteurs de virulence sécrétés 34
2. Biofilm d'*E. faecalis* 36
3. *Quorum-sensing* chez *E. faecalis* 41
4. Systèmes à deux composants 44
II. Endocrinologie microbienne *46*
A. Histoire et découverte 46
B. Cytokines 48
C. Hormones 49
1. Hormones peptidiques 50
2. Hormones stéroïdiennes 52
D. Neurotransmetteurs 52
III. Catécholamines *54*
A. Catécholamines chez les eucaryotes 54
1. Voie de synthèse et fonctions 54
2. Récepteurs, transporteurs et antagonistes 58
B. Effets des catécholamines chez les procaryotes 62
1. Croissance 62
2. Mobilité 63
3. Adhésion et formation de biofilm 64
4. Cytotoxicité et virulence 67
5. Catécholamines et antibiotiques 68
6. Catécholamines et fer 69
C. Senseurs et transporteurs procaryotes pour les catécholamines 70

OBJECTIFS **75**

MATERIELS ET METHODES **79**

I. Cultures bactériennes *81*
A. Souches bactériennes 81
B. Conservation des souches 81
C. Milieux de culture 82
D. Catécholamines 84
E. Culture bactérienne 84
II. Biologie Moléculaire *85*
A. Construction de la souche H103-GFP 85
B. Extraction d'ADN 85
C. Séquençage de souches 86
D. Extraction des ARN 86
E. Synthèse des ADN complémentaires 87
F. Réactions de polymérisation en chaîne (PCR) 88
G. PCR quantitative en temps réel 88
III. Physiologie bactérienne *90*
A. Mobilités bactériennes 90
B. Sensibilité aux bactériophages 90

C. Extraction des rhamnolipides 91
D. Dosage de la pyoverdine 91
E. Dosage de la pyocyanine 91
F. Etude du biofilm 92
1. Biofilm statique sur surface polystyrène 92
2. Biofilm statique sur surface en verre 92
3. Biofilm dynamique en flow-cell sur surface en verre 93
G. Virulence 95
1. Maintien des cultures de *C. elegans* et test de virulence 95
2. Test de virulence sur *Galleria mellonella* 96
IV. Culture cellulaire 97
A. Lignées cellulaires et milieux de cultures 97
B. Culture des cellules 98
C. Adhésions sur cellules 98
V. Analyse protéomique globale 99
IV. Analyses in silico 99
A. Alignement de séquences 99
B. Analyses de docking moléculaire 99

RESULTATS 101

CHAPITRE I : EFFET DE L'EPINEPHRINE SUR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* H103 EN MILIEU LB 103
I. Introduction 105
II. Article 1 107
III. Résultats complémentaires 109
IV. Discussion 115
CHAPITRE II : EFFET DE L'EPINEPHRINE SUR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* H103 EN MILIEU MINIMUM SERUM-SAPI 119
I. Introduction 121
II. Résultats 122
III. Discussion 132
CHAPITRE III : EFFET DES CATECHOLAMINES SUR DES SOUCHES D'*ENTEROCOCCUS FAECALIS* 137
I. Introduction 139
II. Article 2 141
III. Discussion 143
CHAPITRE IV : RECHERCHE DE SENSEURS ADRENERGIQUES PUTATIFS CHEZ *P. AERUGINOSA* ET *E. FAECALIS* 147
I. Introduction 149
II. Résultats 149
III. Conclusion 166

CONCLUSION 169

REFERENCES 177

ANNEXES 201

Liste des figures

Figure 1. Microorganismes fréquemment rencontrés lors d'infections nosocomiales 12
Figure 2. Sites d'infections par *P. aeruginosa* 13
Figure 3. Systèmes de sécrétion chez *P. aeruginosa* 15
Figure 4. Etapes de formation du biofilm 18
Figure 5. Biosynthèse, induction et régulation de facteurs de virulence du système PQS 22
Figure 6. Représentation schématique des systèmes de QS chez *P. aeruginosa* et leur interconnexion 23
Figure 7. Voie HptB dans le cas où HptB est non phosphorylé.....25
Figure 8. Voie HptB dans le cas où HptB est phosphorylé.....26
Figure 9. Structure de la pyoverdine.....27
Figure 10. Synthèse de la pyoverdine et internalisation de la ferripyoverdine par le système FpvA-TonB dépendant.....29
Figure 11. Structure de la pyochéline 29
Figure 12. Internalisation du complexe pyochéline-fer.....30
Figure 13. Synthèse des phénazines chez *P. aeruginosa* 31
Figure 14. Transport du fer Fe^{2+} par le système FeoABC.....31
Figure 15. Facteurs sigma extracytoplasmiques régulés par Fur.....33
Figure 16. Formation du biofilm chez *E. faecalis* 37
Figure 17. Fonctionnement de l'opéron cytolysine sous influence du QS 42
Figure 18. Système Fsr chez *E. faecalis* 43
Figure 19. Effets de l'hôte sur le microbiote.....48
Figure 20. Structures chimiques des catécholamines.....54
Figure 21. Biosynthèse des catécholamines 55
Figure 22. Lieu de production et de sécrétion des catécholamines.....56
Figure 23. Effets de l'épinéphrine et de la norépinéphrine sur la physiologie humaine 57
Figure 24. Récepteur adrénergique de type RCPG 59
Figure 25. Mécanismes d'action de l'épinéphrine et de la norépinéphrine.....60
Figure 26. Recapture des catécholamines par des transporteurs 61
Figure 27. Représentation schématique du système QseBC 71
Figure 28. Système de formation de biofilm en chambre à flux 94
Figure 29. Effet de l'épinéphrine sur le swimming 109
Figure 30. Sensibilité de *P. aeruginosa* H103 au phage Pf4 en présence d'épinéphrine. 110
Figure 31. Répartition selon les classes fonctionnelles PseudoCap des protéines différentiellements représentées en condition épinéphrine à 1 µM 111
Figure 32. Courbes de croissance de *P. aeruginosa* H103 en milieu sérum-SAPI 122
Figure 33. Effet de l'épinéphrine sur la production de pyoverdine.....124

Figure 34. Analyse de l'expression des gènes impliqués dans les systèmes d'acquisition du fer 126
Figure 35. Effet de l'épinéphrine sur la croissance des mutants de *P. aeruginosa* PAO1 déficients en sidérophores et transporteurs associés.....127
Figure 36. Effet de l'épinéphrine sur la production de pyocyanine par *P. aeruginosa* H103 129
Figure 37. Courbes de survie de *C. elegans* après infection avec *P. aeruginosa* H103 130
Figure 38. Alignement des séquences de QseC (UniProtKB - Q8X524) d'*E.coli* et PmrB (UniProtKB - Q9HV31) de *P. aeruginosa* 150
Figure 39. Alignement des séquences de QseB (UniProtKB - Q8XBS3) d'*E. coli* et PmrA (UniProtKB - Q9HV32) de *P. aeruginosa* 151
Figure 40. Organisation génomique de *qseBC*.....152
Figure 41. Localisation de *pmrAB* et *carO* (*ygiW,* PA0320*)* chez *P. aeruginosa* 153
Figure 42. Représentation de l'organisation des domaines protéiques de QseC d'*E. coli* et PmrB chez *P. aeruginosa* 153
Figure 43. Alignement des séquences périplasmiques de QseC d'*E. coli* et PmrB de *P. aeruginosa* 154
Figure 44. Structure prédictive de PmrB chez *P. aeruginosa* 155
Figure 45. Modélisation des interactions entre l'épinéphrine et PmrB de *P.aeruginosa* 155
Figure 46. Modélisation des complexes norépinéphrine-Fe et entérobactine-Fe 157
Figure 47. Modélisation du complexe épinéphrine-fer 157
Figure 48. Modélisations de la structure de FpvA liée avec la ferripyoverdine et avec le complexe épinéphrine-fer 158
Figure 49. Interactions entre FpvA et le complexe épinéphrine-fer 159
Figure 50. Interactions entre le transporteur FpvA et le complexe ferripyoverdine 160
Figure 51. Alignement des séquences protéiques de QseC d'*E.coli* (UniProtKB - Q8X524) et VicK d'*E. faecalis* MMH594 161
Figure 52. Alignement multiple des séquences VicK des quatre souches d'*E. faecalis* 162
Figure 53. Représentation de l'organisation des domaines protéiques de VicK chez *E. faecalis* 162
Figure 54. Alignement des séquences comprises entre les domaines transmembranaires de QseC (UniProtKB - Q8X524) d'*E. coli* et VicK (UniProtKB - Q836C1) d'*E. faecalis*.....163
Figure 55. Structure prédictive du senseur VicK d'*E. faecalis* 164
Figure 56. Modélisation des interactions entre l'épinéphrine et VicK d'*E. faecalis* 164
Figure 57. Interaction pour un modèle d'interaction possible entre VicK et l'épinéphrine.....165

Liste des tableaux

Tableau 1. Systèmes TCS chez *E. faecalis* 44
Tableau 2. Effets des catécholamines et antagonistes sur le swimming 63
Tableau 3. Effets des catécholamines sur l'adhésion de bactéries sur cellules eucaryotes 65
Tableau 4. Effets des catécholamines sur la formation de biofilm 66
Tableau 5. Liste des récepteurs adrénergiques bactériens alternatifs 72
Tableau 6. Liste des souches bactériennes.....81
Tableau 7. Composition du milieu Luria-Bertani (LB).....82
Tableau 8. Liste des milieux et leur composition 83
Tableau 9. Catécholamines utilisées dans cette étude 84
Tableau 10. Mix réactionnel et cycle de la RTq-PCR.....87
Tableau 11. Amorces utilisées pour l'étude de l'expression des gènes en RTq-PCR 89
Tableau 12. Lignées cellulaires 97
Tableau 13. Composition du milieu DMEM complet.....97
Tableau 14. Protéines identifiées à la suite de l'analyse Orbitrap dans la condition épinéphrine 113
Tableau 15. Recherche d'homologues protéiques des récepteurs alternatifs (QseEF, BasRS et CpxAR) chez *P. aeruginosa* 151

Liste des abréviations

3 oxo C12 : 3-oxo-C12-homosérine lactone

ACE : Adhesin to collagen of *Enterococcus*

ACTH : Adrénocorticotrophine

AD : Adénylate cyclase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADNe : ADN extracellulaire

AHL : Acyl homosérine lactone

AI-3 : Autoinducteur 3

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ANP : Auricular natriuretic peptide

ARN : Acide ribonucléique

AS : Substance d'agrégation

BHI : Brain heart infusion

BNP : Brain natriuretic peptide

Bop : Biofilm on plastic

C4- HSL : C4-homosérine lactone

Caf1A : Capsule antigen F1 assembly

c-di-GMP : diguanylate mono-phosphate cyclique

CFTR : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CNP : C-type natriuretic peptide

COMT : Catéchol-O-méthyltransférase

CT : Cycle threshold

DEPC : Diéthyle pyrocarbonate

DGlc-DAG : α-diglycosyl-diacylglycerol

DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium

DO : Densité optique

DOPA : Dihydro-phénylalanine

Ebp : Endocarditis and biofilm-associated pilus

ECET : *Escherichia coli* entérotoxigénique

ECF : Fonction extracytoplasmique

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

EF-Tu : Elongation Factor Thermo unstable

EPS : Exopolysaccharides

Esp : *Enterococcus* surface protein

GABA : Acide γ-aminobutyrique

GBAP : Gelatinase biosynthesis-activating pheromone

Gm : Gentamycine

HCN : Cyanure d'hydrogène

HK : Histidine kinase

IFN : Interféron

IL : Interleukine

IP3 : Inositol triphosphate

LB : Luria Bertani

Lf : Lactoferrine

LPS : Lipopolysaccharide

MAO : Monoamine oxydase

MCBL : Microscope confocal à balayage laser

NET : Norepinephrine transporter

NGM : Nematode growth medium

OCT : Organic cation transporter

PBS : Tampon phosphate salin

PCR : Polymerase chain reaction

PIP_2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PMAT : Plasma membrane monoamine transporter

PQS : *Pseudomonas* quinolone signal

QS : *Quorum-sensing*

RCPG : Récepteur couplé à une protéine G

RHE : Epiderme humain reconstitué

Rpm : Rotation par minutes

RR : Régulateur de réponse

SP : Substance P

SVF : Sérum de veau fœtal

TBDR : Récepteur TonB dépendant

TCS : Système à deux composants

Tet : Tétracycline

Tf : Transferrine

TLR : Toll-like receptor

TNF : Facteur de nécrose tumorale

UFC : Unité formant colonies

UFP : Unité formant plage de lyse

Introduction

I. Pathogènes opportunistes

Un des enjeux actuels de notre société est la lutte contre les infections nosocomiales contractées au sein d'un établissement de santé (hôpital, clinique…). Ces infections sont définies de la façon suivante « Les infections nosocomiales sont les infections qui sont acquises dans un établissement de soins. Une infection est considérée comme telle lorsqu'elle était absente à l'admission. Lorsque l'état infectieux du patient à l'admission est inconnu, l'infection est classiquement considérée comme nosocomiale si elle apparaît après un délai de 48h d'hospitalisation. Ce délai est cependant assez artificiel et ne doit pas être appliqué sans réflexion. ». Après une intervention chirurgicale, le délai peut aller jusqu'à 30 jours et voire un an en cas de mise en place de prothèses ou d'implants. Ces infections vont donc entraîner des surcoûts, notamment par l'allongement de la durée d'hospitalisation, les traitements et les examens médicaux supplémentaires, mais aussi par les programmes de prévention mis en place.

Ces infections sont provoquées par des microorganismes dont la pathogénicité est quasi inexistante chez un individu sain. Cependant, l'affaiblissement de l'état de santé d'une personne peut amener à un processus infectieux, initié par des bactéries que l'on dit pathogènes opportunistes. En France, des enquêtes nationales de prévalence des infections nosocomiales permettent d'établir une liste de pathogènes régulièrement retrouvés. Une dizaine de pathogènes sont ainsi régulièrement impliqués dans des infections nosocomiales. Parmi eux, trois sont responsables de près de la moitié des infections recensées en 2012, il s'agissait de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Une étude plus récente de 2017, montre qu'*Enterococcus faecalis* est maintenant placée légèrement devant *P. aeruginosa*, en termes de fréquence d'implication dans des infections nosocomiales, et près de la moitié de ces infections sont liées à l'un de ces quatre microorganismes [Figure 1].

I. Pathogènes opportunistes

MICRO-ORGANISMES RESPONSABLES D'INFECTIONS NOSOCOMIALES ET CARACTÉRISTIQUES DE RÉSISTANCE

Pour les micro-organismes les plus fréquemment rapportés

	PART RELATIVE			PRÉVALENCE DES PATIENTS INFECTÉS	
Micro-organisme	**n**	**%**	**IC95 %**	**%**	**IC95 %**
Escherichia coli	904	23,59	[21,89-25,37]	1,08	[0,98-1,19]
Staphylococcus aureus	601	13,83	[12,39-15,41]	0,64	[0,56-0,71]
Enterococcus faecalis	288	6,50	[5,61-7,52]	0,30	[0,24-0,35]
Pseudomonas aeruginosa	285	6,28	[5,24-7,51]	0,29	[0,22-0,35]
Klebsiella pneumoniae	266	5,60	[4,80-6,52]	0,26	[0,21-0,30]
Staphylococcus epidermidis	251	5,39	[4,48-6,47]	0,25	[0,20-0,30]
Enterobacter cloacae	185	3,78	[3,02-4,72]	0,17	[0,13-0,22]
Proteus mirabilis	130	2,92	[2,37-3,58]	0,13	[0,10-0,16]
Clostridium difficile	83	2,31	[1,77-3,00]	0,11	[0,08-0,13]
Candida albicans	67	1,53	[1,13-2,07]	0,07	[0,05-0,09]
Enterococcus faecium	66	1,51	[1,15-2,00]	0,07	[0,05-0,09]
Streptocoques, autre espèce	51	1,39	[0,98-1,96]	0,06	[0,04-0,09]
Citrobacter koseri (ex. *diversus*)	49	1,34	[0,92-1,94]	0,06	[0,04-0,09]
Klebsiella oxytoca	44	1,22	[0,73-2,03]	0,06	[0,03-0,08]
Staphylocoque coagulase négative, autre	66	1,11	[0,76-1,60]	0,05	[0,03-0,07]
Staphylococcus haemolyticus	52	1,02	[0,72-1,45]	0,05	[0,03-0,07]
Enterobacter aerogenes	42	0,96	[0,61-1,49]	0,04	[0,02-0,07]
Autre *Pseudomonas* spp. et apparentés	35	0,92	[0,61-1,37]	0,04	[0,03-0,06]
Morganella spp.	48	0,83	[0,60-1,16]	0,04	[0,03-0,05]
Autres	709	16,30			
TOTAL	4 232	100,00			

Figure 1. Microorganismes fréquemment rencontrés lors d'infections nosocomiales (Enquête nationale de prévalence 2017 https://www.santepubliquefrance.fr/)

Ces deux bactéries, *P. aeruginosa* et *E. faecalis*, sont présentes chez l'Homme, notamment dans l'intestin (**Stoodle & Thom**, 1970), au niveau de la peau (**Kong**, 2011; **Shami et al.**, 2019), et également au sein de divers organes lors d'infections (poumons, cœur, peau).

A. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa a été isolée d'une plaie infectée et cultivée pour la première fois en 1882 par le pharmacien militaire français Carle Gessard (**Carle Gessard**, 1882). Bacille à Gram négatif et ubiquitaire, elle peut être retrouvée dans divers environnements, tellurique, aquatique mais également faisant partie du microbiote humain. Depuis de nombreuses années, *P. aeruginosa* s'est imposée comme une bactérie pathogène de nombreux organismes, plantes, insectes, ou de l'Homme. Chez ce dernier, elle est capable d'infecter de nombreux tissus [Figure 2].

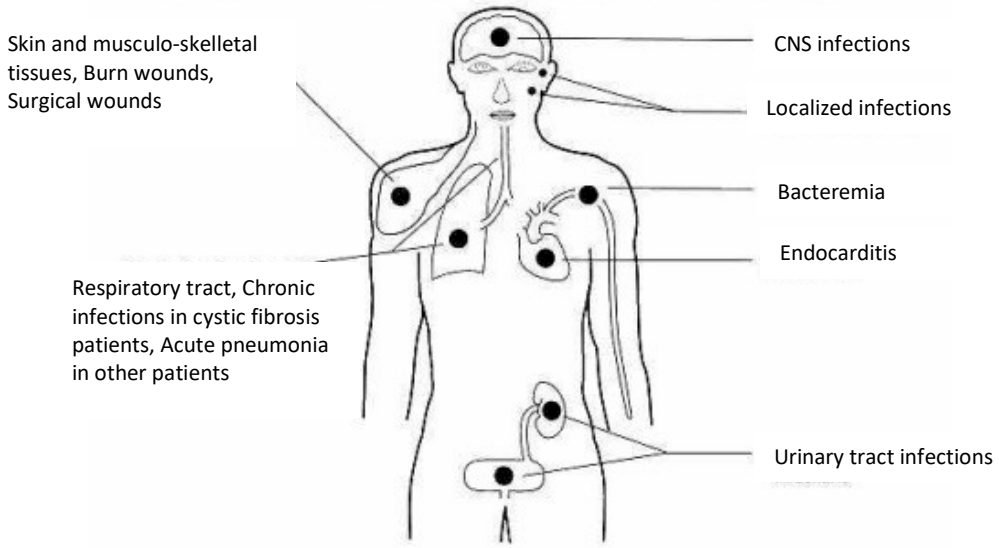


Figure 2. Sites d'infections par *P. aeruginosa (https://breannagorry.weebly.com/)*

Définie pathogène opportuniste, elle peut, en effet provoquer de nombreuses infections chez des personnes immunodéprimées, hospitalisées ou blessées. Elle est notamment responsable de la mortalité importante de patients atteints de mucoviscidose. *P. aeruginosa* est également une bactérie résistante aux antibiotiques et a été récemment classée par l'Organisation Mondiale de

la Santé comme une bactérie critique d'un point de vue antibiorésistance, pour laquelle il était urgent de trouver de nouveaux traitements. La souche *P. aeruginosa* PAO1 possède un large génome (6,4 kb) (**Stover et al.**, 2000) ainsi que de nombreux facteurs de régulation lui conférant une grande adaptabilité et le développement de résistances à de nombreux antibiotiques. La mise en place de pompes à efflux ou encore la formation de biofilm font partie des stratégies établies par ce pathogène pour lutter contre les antibiotiques.

P. aeruginosa est connue pour posséder deux grandes formes de virulence : la virulence de type chronique associée à un mode de vie sessile dans lequel les bactéries forment des biofilms et un mode de vie planctonique où s'établit une virulence de type aiguë, notamment par la production de facteurs de virulence. Ces deux types de virulence sont décrits ci-après.

1. Virulence de type aiguë

La virulence de type aiguë est caractérisée par l'expression d'un nombre important de facteurs de virulence pouvant être sécrétés ou bien exprimés à la surface de la cellule bactérienne.

Parmi les facteurs de virulence sécrétés par la bactérie, on retrouve des toxines. L'exotoxine A est considérée comme une des toxines les plus importantes chez *P. aeruginosa*. Sécrétée par le système de sécrétion de type II, cette toxine possède deux domaines, A et B. Le domaine A porte l'activité enzymatique, tandis que la partie B de la toxine va se fixer sur un récepteur spécifique à la surface de la cellule cible. Cette sécrétion de toxine résulte en l'arrêt de la synthèse protéique de la cellule cible, contribuant à la mort cellulaire (**West**, 2000). Ce système de sécrétion de type II permet aussi de sécréter des élastases (LasA et LasB), qui sont nécessaires à la dégradation de protéines telles que l'élastine, le fibrinogène ou encore le collagène (**Wretlind & Pavlovskis**, 1983) mais aussi des protéases de type phospholipases, lipases ou encore des hémolysines (**Bordi et al.**, 2010). D'autres systèmes de sécrétion sont impliqués dans le relargage de toxines, comme par exemple le système de sécrétion de type III. Il permet la sécrétion de

protéines effectrices ExoS, ExoT, ExoU et ExoY dans le cytoplasme de la cellule de l'hôte (**Galle et al.**, 2012). Chacune des protéines va exercer un rôle spécifique, ExoS provoque l'apoptose des cellules, ExoU lyse les cellules, et les deux peuvent aussi inhiber la production d'interleukine. ExoY va désorganiser le cytosquelette d'actine et augmenter la perméabilité cellulaire et enfin ExoT inhibe le processus de cicatrisation des cellules, facilitant la propagation du pathogène (**Hauser**, 2009). D'autres systèmes de sécrétion existent chez *P. aeruginosa* PAO1 [Figure 3] : le type I permet de délivrer, entre autres, une protéase alcaline, le système de sécrétion de type V sécrète des protéases et nécessite, comme pour le type II, l'importation des protéines dans le périplasme par la voie Sec/Tat. Enfin le type VI permet la sécrétion directe de toxines dans la membrane ou le cytoplasme de la cellule cible (**Bleves et al.**, 2010).

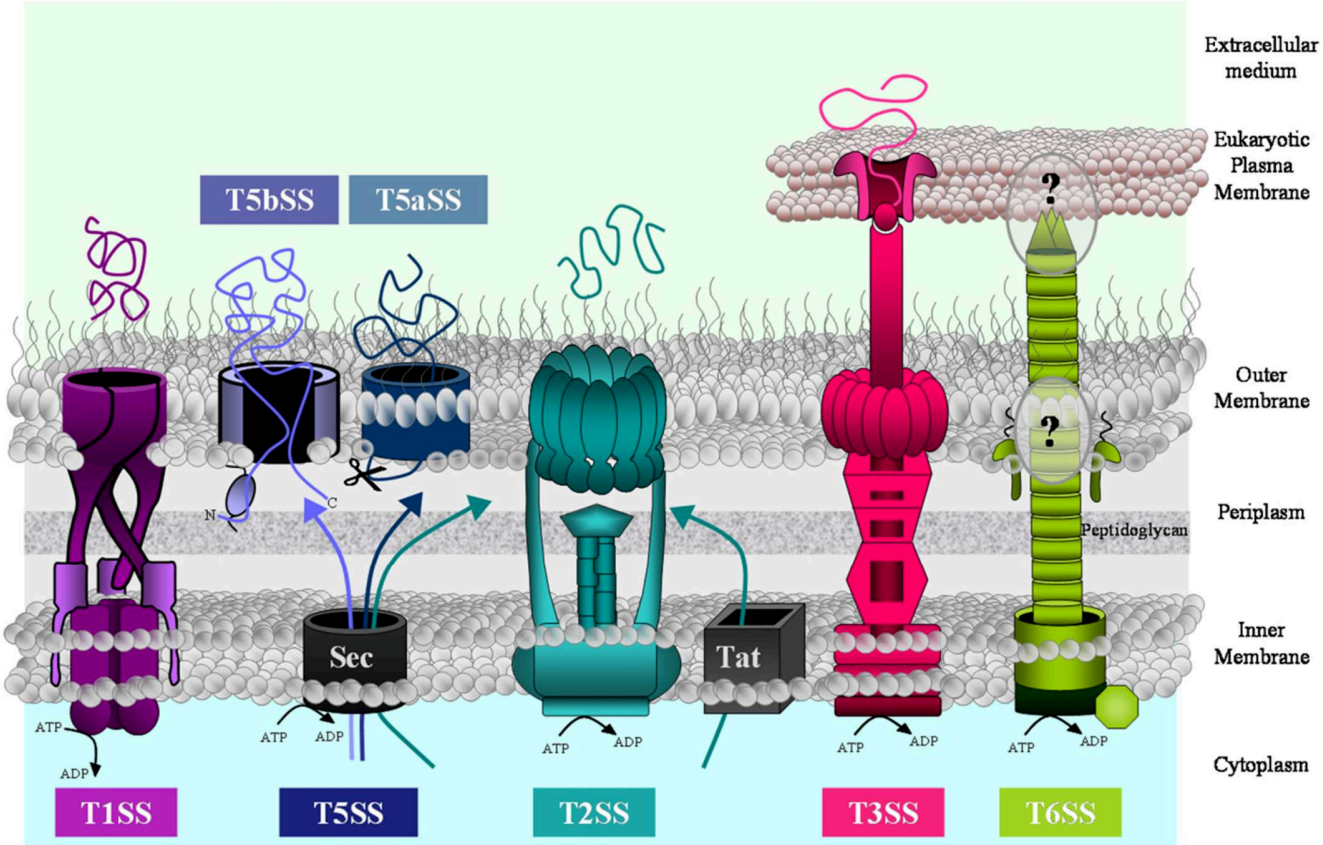


Figure 3. Systèmes de sécrétion chez *P. aeruginosa* (**Bleves et al.**, 2010)

I. Pathogènes opportunistes

Les rhamnolipides, autres facteurs de virulence impliqués dans la virulence aiguë, sont des glycolipides extracellulaires produits par *P. aeruginosa* et considérés comme des biosurfactants par leur propriété tensioactive. Ils sont composés de rhamnoses liés à des acides gras β-hydroxylés et peuvent se trouver sous forme de mono ou de di-rhamnolipide. Leur biosynthèse se fait grâce aux produits des gènes *rhlA*, *rhlB* et *rhlC* (**Deziel et al.**, 2003). La production de rhamnolipides coïncide avec la phase stationnaire de croissance et est contrôlée par le *quorum-sensing* (QS) (**Reis et al.**, 2011). Le rôle des rhamnolipides dans la physiologie de la cellule bactérienne est encore flou, cependant, il a été montré que ces rhamnolipides sont impliqués dans la pathogénicité bactérienne en altérant les jonctions serrées des cellules de l'hôte (**Zulianello et al.**, 2006) ou encore en inhibant l'activité ciliaire des cellules eucaryotes (**Hastie et al.**, 1986). Ces rhamnolipides entrent également en jeu dans la mobilité de type swarming (**Caiazza et al.**, 2005) et ont un rôle important dans l'architecture du biofilm bactérien (**Davey et al.**, 2003; **Nickzad & Déziel**, 2014).

En plus des protéines sécrétées, la bactérie possède des éléments à sa surface qui lui confère aussi un pouvoir pathogène. Le lipopolysaccharide (LPS), par exemple fait partie de ces éléments. Il se compose de trois parties, le lipide A avec un domaine peu variable, le cœur oligosaccharidique très conservé et enfin une partie très variable, une chaine polysaccharidique plus ou moins longue nommé l'antigène O (**Pier**, 2007). Le lipide A du LPS peut être reconnu par le Toll-Like Receptor 4 (TLR-4) des cellules, entrainant une réponse inflammatoire chez l'hôte, notamment par la production de cytokines. Le cœur oligosaccharidique peut, quant à lui, être reconnu par la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), protéine mutée chez les patients atteints de mucoviscidose, empêchant ainsi l'internalisation de la bactérie, qui semble important pour la défense de l'hôte (**Pier et al.**, 1996). Une modification du LPS peut conduire à des altérations d'adhésion ou entrainer l'agrégation des cellules bactériennes entre elles, affectant les mobilités de type swimming et swarming (**Lindhout et al.**, 2009). Le flagelle, utilisé dans ces deux mobilités, est également impliqué dans la pathogénicité. La virulence de cette bactérie est atténuée en son absence (**Montie et al.**, 1982). Les pili de type IV

sont les adhésines majoritaires chez *P. aeruginosa*, ils permettent entre autres l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales et font partie intégrante de la mobilité de type twitching.

2. Virulence de type chronique : le biofilm

Associés à un mode de vie sessile, les biofilms bactériens sont un moyen pour les bactéries d'échapper à un environnement hostile. Ce mode de vie est considéré comme le plus fréquent dans le monde bactérien. Ces biofilms constituent des communautés organisées de cellules adhérées à des surfaces biotiques telles que des épithéliums ou des surfaces abiotiques, associées entre elles et enveloppées dans une matrice extracellulaire composée d'exopolysaccharides (EPS), de protéines mais aussi d'ADN extracellulaire (ADNe) (**Costerton et al.**, 1999). La vie en biofilm apporte aux bactéries une résistance aux agents antimicrobiens, au système immunitaire de l'hôte, les protège de conditions environnementales défavorables et permet d'augmenter la diversité génétique (**Donlan**, 2002; **Donlan & Costerton**, 2002). Dans le monde hospitalier, ces biofilms sont retrouvés sur des dispositifs médicaux, tels que les cathéters, prothèses ou implants et posent de nombreux problèmes en raison de leur résistance aux différents traitements antibiotiques (**Hassett et al.**, 2010; **Stewart & William Costerton**, 2001). Ces biofilms sont aussi récurrents chez les patients atteints de mucoviscidose, où les biofilms formés par *P. aeruginosa* conduisent souvent au décès du patient.

Il est généralement considéré que les principales étapes de formation d'un biofilm sont : le déplacement des bactéries vers un support, la fixation des bactéries à ce support, d'abord de façon réversible puis irréversible ; la multiplication bactérienne et la production d'exopolymères, conduisant à la formation de microcolonies puis au développement tridimensionnel du biofilm mature. Enfin, des cellules peuvent se détacher du biofilm mature afin d'aller coloniser d'autres surfaces. Ces étapes sont illustrées sur la [Figure 4].

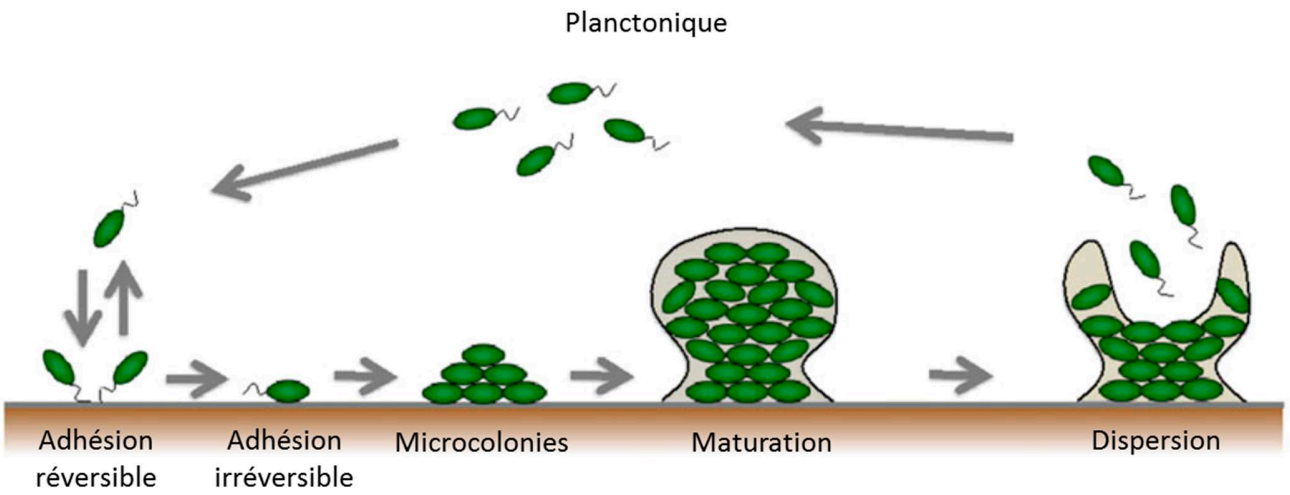


Figure 4. Etapes de formation du biofilm (adaptée de (**Toyofuku et al.**, 2016))

Pour passer d'un mode de vie planctonique à un mode de vie sessile, les bactéries planctoniques vont dans un premier temps adhérer de façon réversible sur des surfaces. Dans cette première étape, les bactéries vont initier l'adhésion à des surfaces en réponse à des signaux environnementaux. L'adhésion devient irréversible lorsqu'elle correspond à une fixation physique des bactéries sur la surface. Pour cela, elles vont mettre en place différents éléments structurels tels que les pili de type IV (**Klausen et al.**, 2003; **O'Toole & Kolter**, 1998), ou les structures de type fimbriae (Cup) assemblées par la voie des chaperonnes/usher qui semblent favoriser les interactions cellules-cellules (**Ruer et al.**, 2007; **Vallet et al.**, 2001). Le gène *sadB* semble également essentiel pour passer d'une adhésion réversible à un stade irréversible, même si la fonction exacte qu'il exerce sur cette transition reste encore flou (**Caiazza & O'Toole**, 2004). Un des exopolysaccharides produits lors de la maturation du biofilm chez *P. aeruginosa*, Pel semblerait également important pour l'établissement de l'adhésion irréversible chez *P. aeruginosa* PAK (**Vasseur et al.**, 2005).

Une fois les cellules bactériennes adhérées à une surface, la maturation du biofilm va pouvoir commencer. Les bactéries vont former des microcolonies notamment par l'intermédiaire de la mobilité de type twitching impliquant les pili de type IV, et de la production d'EPS composant une partie de la matrice. Les cellules vont se diviser permettant une augmentation rapide de la biomasse (**Stoodley et al.**, 2002).

La maturation du biofilm chez *P. aeruginosa* se traduit par une structuration et une croissance tridimensionnelle souvent représentées par la formation de macrocolonies sous forme de champignons appelés mushroom. La dernière étape de formation d'un biofilm se traduit par un retour à la vie planctonique dans une étape appelée dispersion.

La matrice est également composée d'ADNe et de protéines. Cette matrice permet aux bactéries de résister aux traitements antibiotiques mais aussi d'échapper au système immunitaire de l'hôte (**Meluleni et al.**, 1995). Cet ensemble d'éléments formant un biofilm mature provoque une hétérogénéité. En effet, au sein d'un biofilm la mise en place de gradients d'oxygénation, de nutriments, de pH, vont engendrer des activités métaboliques différentes, en fonction de l'emplacement des bactéries au sein du biofilm (**Costerton et al.**, 1994; **Stewart & Franklin**, 2008).

Les EPS participent à l'établissement et au maintien de structures tridimensionnelles (**Branda et al.**, 2005). Chez *P. aeruginosa* les EPS sont au nombre de trois : l'alginate, pel et psl. La production d'alginate engendre un phénotype de type mucoïde, qui est le phénotype souvent retrouvé chez les souches isolées chez des patients atteints de mucoviscidose. L'expression de l'opéron *alg*, composé de 12 gènes est sous le contrôle du facteurs sigma AlgU.

L'expression de Pel, polymère cationique, repose sur un opéron constitué de 7 gènes *pelA-F*. Sa structure est bien moins connue que pour l'alginate et sa synthèse reste encore à élucider, cependant, depuis 2007, il est connu que sa production intervient lorsque le taux de c-di-GMP, messager secondaire, est élevé (**Lee et al.**, 2007) et qu'elle requiert la présence d'AlgC (**Ma et al.**, 2012). La présence de Pel est nécessaire pour maintenir les interactions entre cellules au sein du biofilm, il permet la formation de biofilm à l'interface air-liquide aussi appelée pellicule (**Colvin et al.**, 2011; **Mann & Wozniak**, 2012), mais interagit aussi avec d'autres éléments du biofilm, notamment l'ADNe avec lequel il forme des interactions ioniques (**Jennings et al.**, 2015).

Pel permettrait également de mieux résister à certains antibiotiques comme la tobramycine (**Colvin et al.**, 2011). En effet, chez des biofilms de la souche PA14, une surexpression ou une mutation de *pel*, impacte la sensibilité aux aminoglycosides. Le mécanisme par lequel Pel agirait n'est pas connu mais les auteurs émettent l'hypothèse qu'il pourrait, comme d'autres polysaccharides, séquestrer l'antibiotique.

Le troisième EPS produit est Psl, mieux connu que Pel, son expression est liée à un opéron contenant 15 gènes chez *P. aeruginosa* PAO1 (**Mann & Wozniak**, 2012). Psl est un pentasaccharide présent à la surface bactérienne, composé de D-mannose, D-glucose, and L-rhamnose, nécessaire au maintien des interactions entre cellules (**Ma et al.**, 2012) et à l'adhésion aux surfaces (**Byrd et al.**, 2010). Tout comme pour Psl, AlgC est indispensable pour sa synthèse de même que le taux de c-di-GMP (**Borlee et al.**, 2010).

En plus des EPS, l'ADNe est un des composants majeurs de la matrice d'un biofilm (**Whitchurch et al.**, 2002). Cet ADNe est présent dans le biofilm suite à des lyses de sous populations bactériennes, dont une partie semblerait initiée par le QS (**Allesen-Holm et al.**, 2006). L'ADNe va influencer l'hydrophobicité de la surface bactérienne, et va également intervenir dans la résistance face aux antibiotiques, par sa capacité à chélater cations (grâce aux charges négatives de l'ADNe) et peptides antimicrobiens cationiques (**Okshevsky & Meyer**, 2015).

Les protéines présentes dans la matrice permettent aussi le maintien du biofilm. L'adhésine CdrA interagit avec Psl stimulant l'autoagrégation cellulaire (**Borlee et al.**, 2010). La protéine CdrA peut aussi stabiliser et assurer la bonne localisation de Psl, tout en la protégeant de la protéolyse (**Reichhardt et al.**, 2018). Les lectines LecA et LecB jouent aussi un rôle dans la stabilité et la structure du biofilm grâce à leur capacité d'adhésion sur des surfaces eucaryotes (**Diggle et al.**, 2006).

Les rhamnolipides impliqués dans la virulence aiguë de *P. aeruginosa* jouent un rôle dans la structure du biofilm. Ils vont permettre la formation des microcolonies et la mobilité des cellules bactériennes du bas du biofilm vers le haut à un stade plus avancé, favorisant la formation de structure de type mushroom (**Pamp & Tolker-Nielsen**, 2007).

3. *Quorum-sensing* chez *P. aeruginosa*

Pour beaucoup d'espèces bactériennes, la formation de biofilm ainsi que la virulence sont étroitement liées à une régulation par des systèmes de communication intra-espèce de type QS. Le QS repose sur une notion de densité cellulaire. L'accumulation extracellulaire de molécules signal (appelées autoinducteurs) permet, lorsque la densité de population est suffisante, d'induire une réponse coordonnée se traduisant par l'expression de gènes spécifiques, impliqués dans diverses fonctions physiologiques (**LaSarre & Federle**, 2013). Le QS va notamment jouer un rôle essentiel dans la régulation de la virulence et du biofilm chez *P. aeruginosa,* en modulant l'activité d'environ 10% des gènes (**Schuster & Greenberg**, 2006).

Il existe chez *P. aeruginosa* trois systèmes de QS, le système LasI/R, le système RhlI/R et le système *Pseudomonas Quinolone Signal* (PQS).

Les systèmes Las et Rhl fonctionnent sur le même principe. Les autoinducteurs de ces systèmes sont des acyl homosérine lactones (AHL), molécules impliquées dans de nombreux autres systèmes de QS chez des bactéries à Gram négatif. Ces molécules sont constituées d'un noyau homosérine lactone et d'une chaîne acyle plus ou moins grande (**Churchill & Chen**, 2011). Dans ces systèmes, LasI et RhlI sont les enzymes qui vont permettre la synthèse des AHL. LasI va synthétiser la molécule signal 3-oxo-C12-homosérine lactone (3-oxo-C_{12}) et RhlI va, quant à lui, produire la C4-homosérine lactone (C_4-HSL). LasR et RhlR sont les récepteurs qui vont former un complexe avec leur autoinducteur respectif pour réguler la transcription d'un certain nombre de gènes cibles (**Parsek & Greenberg**, 2000). Leur fixation s'effectue sur des séquences spécifiques se trouvant dans les régions promotrices des gènes qu'ils régulent (**Schuster & Greenberg**, 2007).

Le troisième système diffère un peu des deux autres et a été découvert en 1999 (**Pesci et al.**, 1999). Ce système appelé PQS pour *Pseudomonas Quinolone Signal* repose sur la molécule signal 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone [Figure 5]. La synthèse de cette molécule est plus complexe que pour les AHL et repose sur l'expression d'un cluster de gènes *pqsABCDE*, *phnAB* et *pqsH* (**Gallagher et al.**, 2002). En effet, cette synthèse va se faire en plusieurs étapes, la première étant la conversion de l'anthranilate, obtenue par l'action de PqsA, en 2-heptyl-4-quinolone aussi appelé HHQ. Cette dernière est le précurseur de PQS, il va être converti grâce à PqsH. L'expression

de l'opéron *pqsABCDE* est contrôlée directement par le régulateur transcriptionnel PqsR (**Lee & Zhang**, 2015).

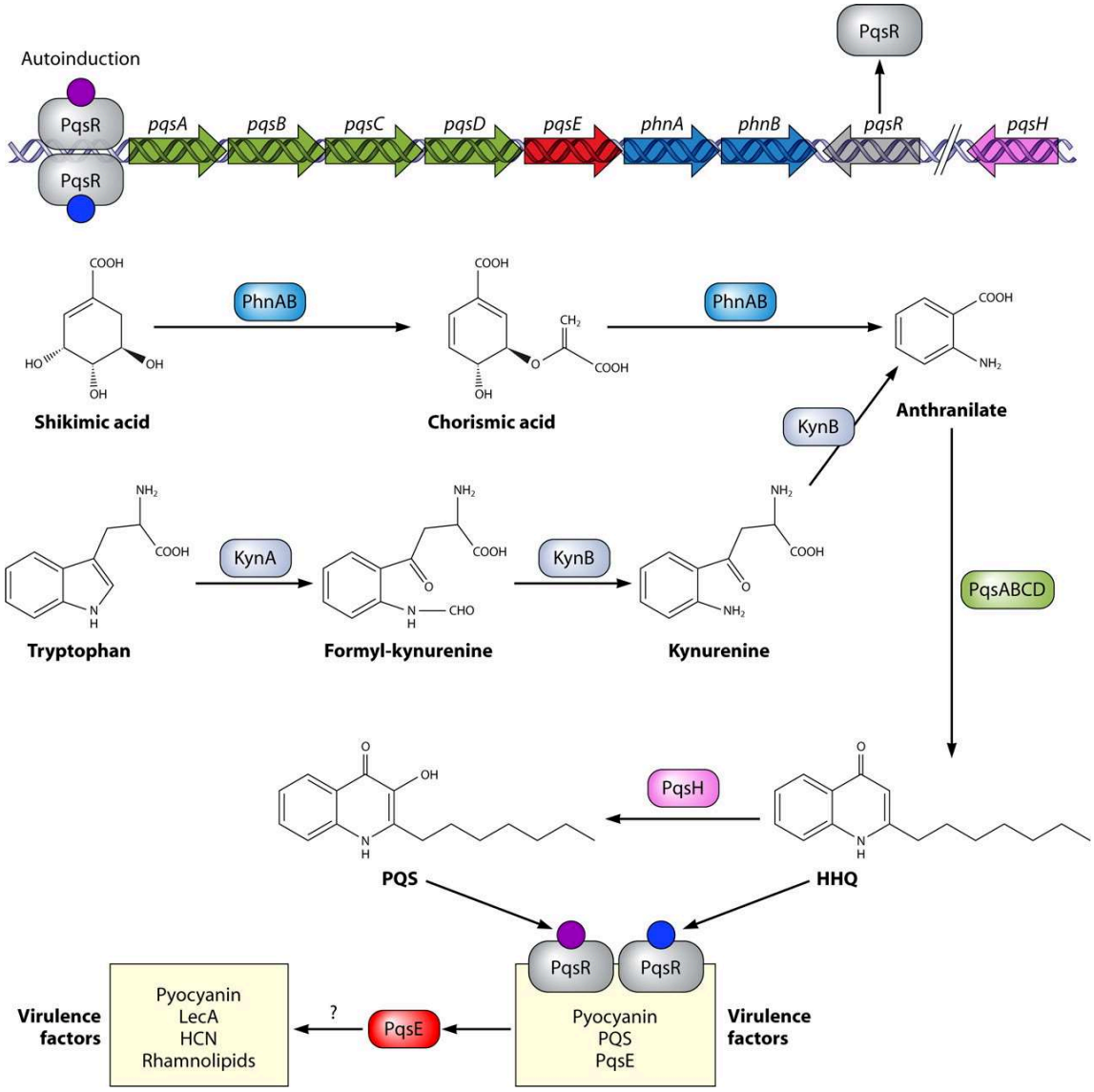


Figure 5. Biosynthèse, induction et régulation de facteurs de virulence du système PQS (**Nadal Jimenez et al.**, 2012).

Ces différents systèmes de QS chez *P. aeruginosa* sont interconnectés entre eux [Figure 6]. Le complexe LasR/3-oxo-C12 peut activer la transcription de *rhlR, rhlI* et *lasI* ainsi que d'autres gènes de virulence tels que *lasA* et *lasB*, le gène codant pour la protéase alcaline, l'exotoxine A ou bien encore le cyanure d'hydrogène. Il peut également réguler *pqsR* de façon positive ainsi

que *pqsH*. PQS est capable de moduler la transcription de *rhlI*, influençant la production de C4-HSL, et de façon générale, de moduler les différents phénotypes dépendants du système Rhl. Il régule aussi l'expression de certains facteurs de virulence comme la pyocyanine ou LecA. RhlR/C4-HSL peut, quant à lui, réguler l'expression de son propre régulon (rhamnolipides, élastase…) ainsi que *rhlI* mais également inhiber l'expression de *pqsR* et de l'opéron *pqsABCDE* (**Lee & Zhang**, 2015).

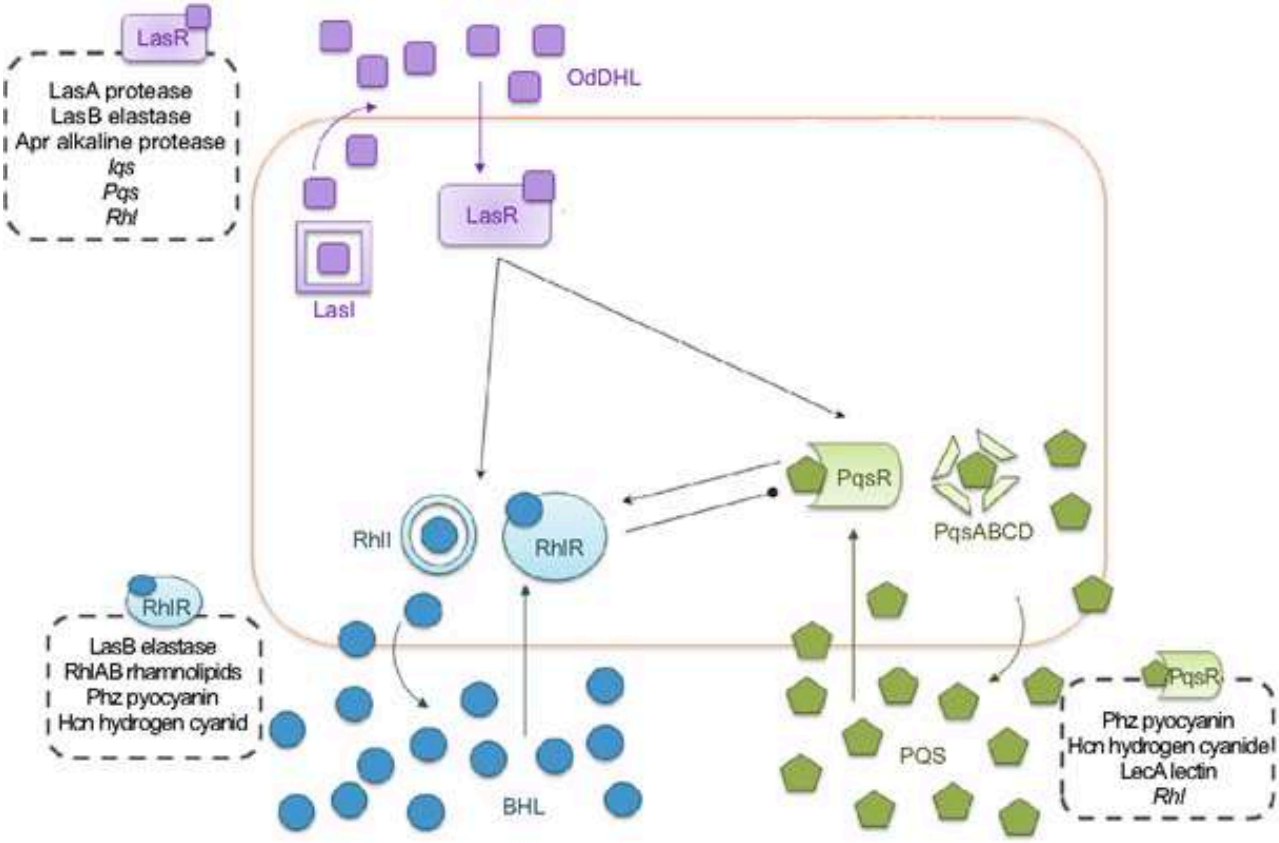


Figure 6. Représentation schématique des systèmes de QS chez *P. aeruginosa* et leur interconnexion (modifiée de (**Lee & Zhang**, 2015))

4. Systèmes à deux composants

La capacité de *P. aeruginosa* à s'adapter rapidement à divers environnements provient, en partie, de ces nombreux systèmes à deux composants (TCS) (**Francis et al.**, 2017). Les TCS sont composés d'un senseur ayant un domaine histidine kinase capable de s'autophosphoryler sur un résidu histidine en réponse à un signal, et un régulateur de réponse sur lequel est transféré le groupement phosphate qui va induire la transcription de certains gènes d'intérêts, en fonction du signal perçu par la bactérie dans son environnement. Une étude menée en 2000, par Rodrigue et al., a permis de déterminer la présence de 63 senseurs histidines kinases et 64 régulateurs de réponses (**Rodrigue et al.**, 2000). Les TCS sont souvent considérés comme des systèmes simples, avec un senseur et un régulateur, or chez *P. aeruginosa* certains systèmes sont plus complexes que cela et impliquent un nombre important de partenaires.

L'un des TCS le plus important chez *P. aeruginosa* est le système Gac déjà évoqué pour son implication dans la formation de biofilm ou encore dans le QS. Ce système est composé de GacS, senseur du système et de GacA, le régulateur de réponse, mais il fonctionne également avec d'autres senseurs et d'autres voies qui y sont étroitement liées, dont la voie HptB. Lorsque GacA est phosphorylé il va activer la transcription de deux gènes *rsmY* et *rsmZ*, qui une fois transcrit en ARN vont se fixer et séquestrer un régulateur post-transcriptionnel RmsA (**Brencic et al.**, 2009). Lorsque RsmA est sous forme libre, il peut se fixer sur certains ARNm, favorisant la dégradation de ces transcrits impliqués dans la virulence de type chronique. GacS est lié à trois autres senseurs kinases RetS, LadS et PA1611. RetS diminue la capacité de GacS à s'autophosphoryler, tandis que LedS va plutôt favoriser cette autophosphorylation (**Ventre et al.**, 2006). Le troisième senseur PA1611, agit indirectement en séquestrant RetS, activant la voie Gac.

La voie HptB est un phosphorelais connecté à quatre senseurs kinases : PA1611, RetS, SagS et ErcS'. HptB va agir sur son régulateur de réponse HsbR qui possède trois domaines différents, un domaine récepteur (REC), un domaine phosphatase (PP2C) et un domaine kinase (K)/anti-sigma (as). En fonction de l'état de phosphorylation de HptB, deux voies d'activation sont possibles. Dans le cas où HsbR est non phosphorylé [Figure 7], cela entraîne la phosphorylation de HsbA qui peut se fixer à HsbD (qui est une diguanylate cyclase), provoquant la libération du

facteur sigma RpoS et la production de c-di-GMP. Le facteur sigma FliA étant séquestré par son anti-sigma FlgM, la transcription de gènes impliqués dans la mobilité est bloquée. Au contraire, dans le cas où HsbR est phosphorylé [Figure 8], son domaine phosphatase entraîne la déphosphorylation de HsbA qui va alors fixer FlgM, libérant ainsi le facteur sigma FliA. Ce dernier va pouvoir initier la transcription de gènes impliqués dans la mobilité. Dans cet état, il n'y a plus de production de c-di-GMP et RpoS est séquestré par HsbR (**Bouillet et al.**, 2019).

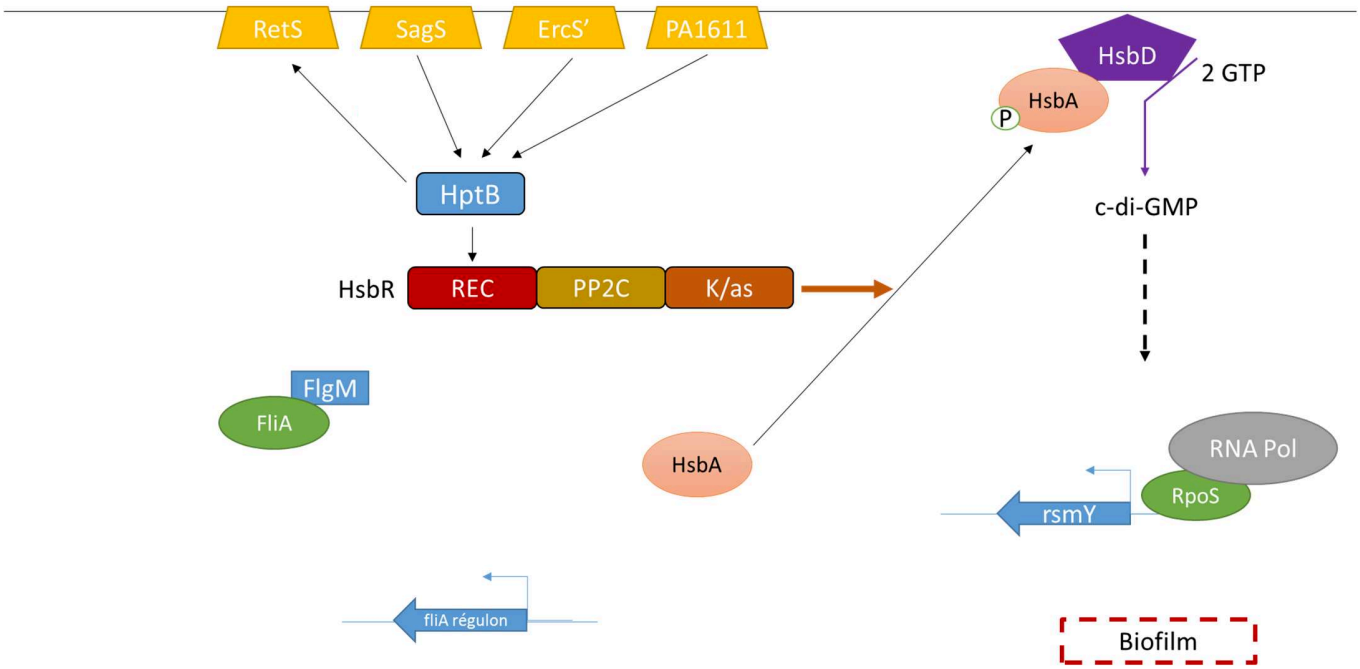


Figure 7. Voie HptB dans le cas où HptB est non phosphorylé (adaptée de **Bouillet et al.**, 2019)

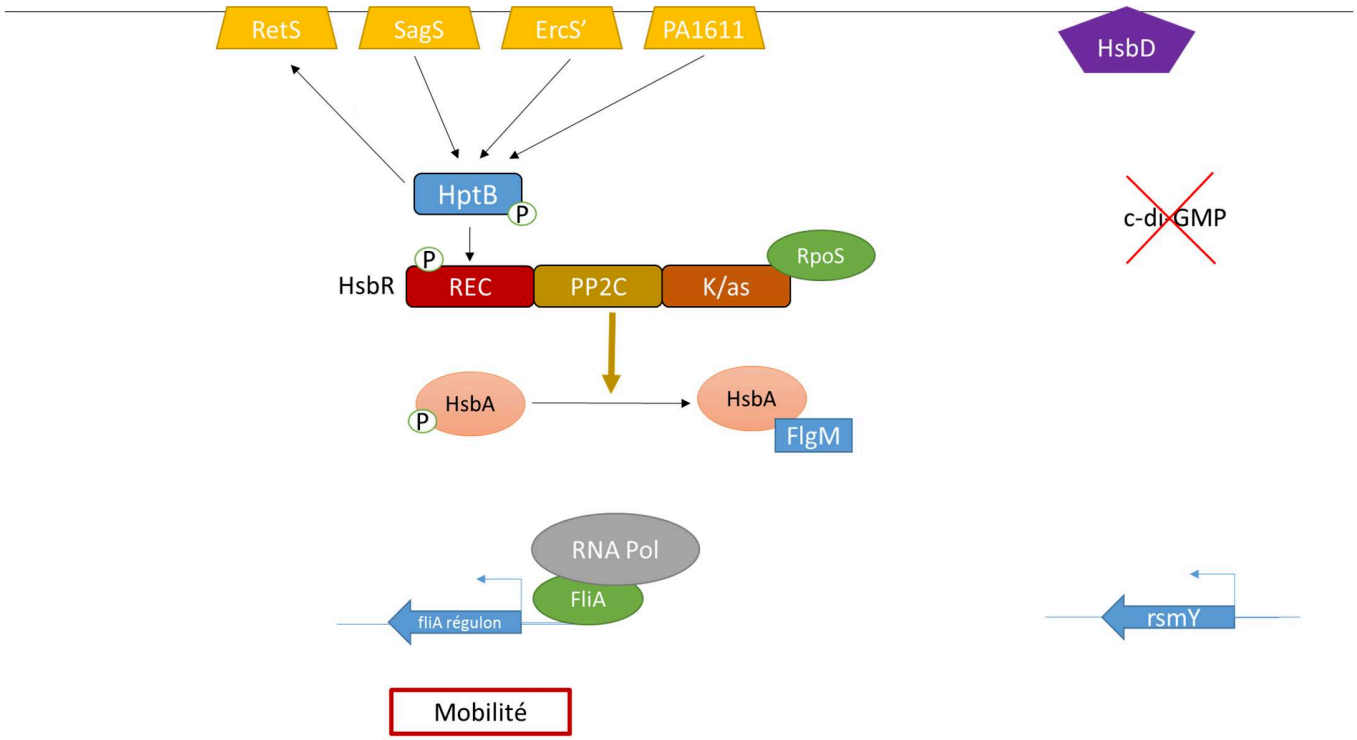


Figure 8. Voie HptB dans le cas où HptB est phosphorylé (adaptée de **Bouillet et al.**, 2019)

Le système PmrAB, par exemple, est un des TCS impliqués dans la modification du LPS et donc dans la résistance à certains antibiotiques comme la polymyxine B. Ce système est activé par une diminution en ions Mg^{2+}, et PmrB phosphorylé va réguler l'expression de l'opéron PA4773-PA4775-*pmr*AB-PA4778. Les gènes PA4773 à PA4775 sont connus pour être impliqués dans la résistance aux peptides antimicrobiens (**Francis et al.**, 2017; **McPhee et al.**, 2006, 2003).

Il existe une multitude d'autres TCS comme le système Roc qui permet la production des fimbriae, impliqués dans l'adhésion, et en parallèle réduit l'expression de la pompe à efflux MexAB-OprM (**Francis et al.**, 2017).

5. Homéostasie du fer chez *P. aeruginosa*

Chez les bactéries, le fer est essentiel pour de nombreuses fonctions, telles que la croissance, la composition cellulaire mais aussi dans le métabolisme intermédiaire ou encore pour certaines réactions enzymatiques (**Messenger & Barclay**, 1983). Le fer existe sous deux états oxydés, le fer ferrique Fe^{3+} et le fer ferreux Fe^{2+}. Le fer, malgré son importance, est très peu disponible. En effet, le fer ferreux Fe^{2+} dans des conditions aérobies est vite oxydé en fer ferrique Fe^{3+}, peu soluble. De plus, lors de l'établissement d'une infection, le fer va être très souvent séquestré par des molécules de l'hôte, comme l'hème, la transferrine ou encore la lactoferrine (**Schaible & Kaufmann**, 2004). Pour cela, *P. aeruginosa* a mis au point des systèmes pouvant capter le fer.

L'un des premiers systèmes va permettre à *P. aeruginosa* de capter le fer sous sa forme ferrique Fe^{3+}. Pour cela, la bactérie va produire des chélateurs de Fe^{3+}, appelés sidérophores. Elle est capable d'en produire deux, la pyoverdine et la pyochéline, avec des affinités plus ou moins élevées pour le fer. L'incorporation de ces complexes fer-sidérophores, au sein de la bactérie s'effectue via des récepteurs TonB dépendants (TBDR).

Le sidérophore ayant l'affinité pour le fer la plus élevée est la pyoverdine [Figure 9]. Elle est composée d'une chaine peptidique et d'un chromophore dont le groupement catéchol va permettre la fixation du Fe^{3+}.

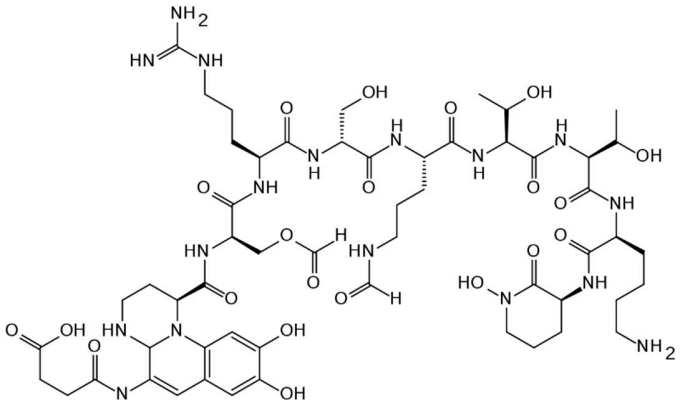


Figure 9. Structure de la pyoverdine

Dans certains milieux, cette molécule qui donne aux cultures de *P. aeruginosa* sa couleur verte spécifique est capable, par sa forte affinité avec le fer, de le récupérer d'un complexe fer-transferrine (**Cornelis & Dingemans**, 2013). La synthèse de ce sidérophore s'effectue en plusieurs étapes, en partant du cytoplasme et finissant dans le périplasme, et implique un nombre important de protéines [Figure 10]. Le précurseur de la pyoverdine est formé dans le cytoplasme grâce à sept enzymes PvdL, PvdI, PvdJ, PvdD, PvdA, PvdF et PvdH, l'ensemble est appelé sidérosome. Ce précurseur ainsi formé est transporté dans le périplasme par PvdE, subissant alors une maturation à l'aide des enzymes PvdQ, PvdN, PvdO et PvdP. Cette molécule mature est sécrétée par le système PvdRT-OpmQ, qui est une pompe à efflux ATP dépendante (**Gasser et al.**, 2015). Lorsque la pyoverdine se fixe au fer, ce complexe est alors capturé par la bactérie par un système récepteur TonB dépendant, qui va, de plus, servir de transducteur du signal. Le récepteur à la pyoverdine FpvA, fixé dans la membrane externe, est lié à un anti-sigma FvpR, qui séquestre les deux facteurs sigma extra-cytoplasmiques FpvI et PvdS. L'énergie nécessaire pour le transport de la ferripyoverdine est apportée par le complexe TonB-ExbB-ExbD situé dans la membrane interne, permettant l'ouverture du plug bloquant jusqu'alors le complexe ferripyoverdine au sein de FpvA. Le changement de conformation de FpvA entraine la protéolyse de FpvR, libérant ainsi les deux facteurs sigma. La pyoverdine peut alors être recyclée et le fer transporté dans le cytoplasme par FpvED et par la suite se fixer sur le régulateur du fer Fur (**Chevalier et al.**, 2019; **Ringel & Brüser**, 2018).

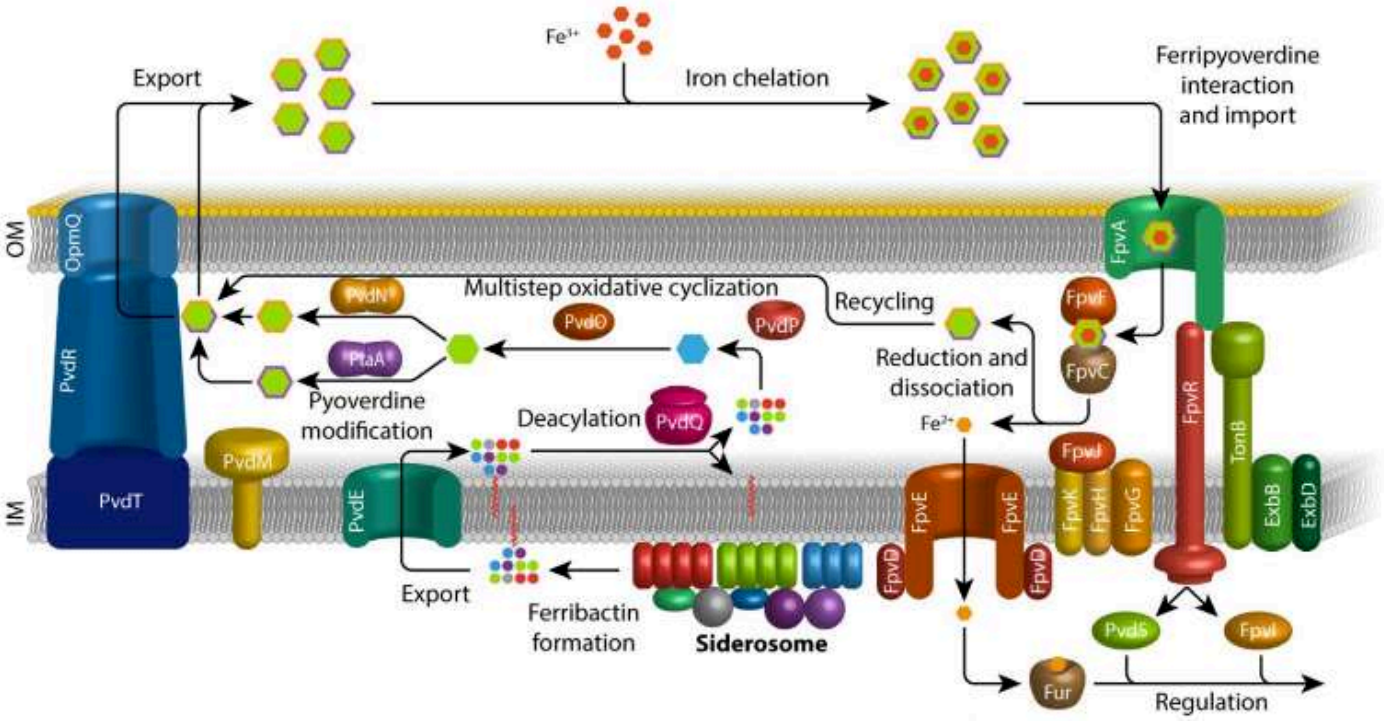


Figure 10. Synthèse de la pyoverdine et internalisation de la ferripyoverdine par le système FpvA-TonB dépendant (**Ringel & Brüser**, 2018).

Le deuxième sidérophore produit par *P. aeruginosa* est la pyochéline [Figure 11].

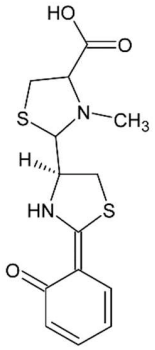


Figure 11. Structure de la pyochéline (**Adler et al.**, 2012)

Son affinité pour le Fe^{3+} est moindre et sa synthèse moins complexe que pour la pyoverdine. En effet, la pyochéline est formée de salicylate et de deux cystéines impliquant PchA, PchB, PchC, PchD, PchE, PchF et PchG, cette synthèse s'effectue dans le cytoplasme de la bactérie

(**Gasser et al.**, 2015). Le système d'export de la pyochéline n'est pas connu. Le complexe ferripyochéline se fixe sur le récepteur TonB dépendant FptA [Figure 12]. Le système TonB-ExbB-ExbD fournit l'énergie pour le transport de la ferripyochéline jusque dans le périplasme, puis celui-ci est pris en charge par la perméase FptX. La dissociation entre le Fe^{3+} et la pyochéline n'est pas encore connue (**Mislin & Schalk**, 2014).

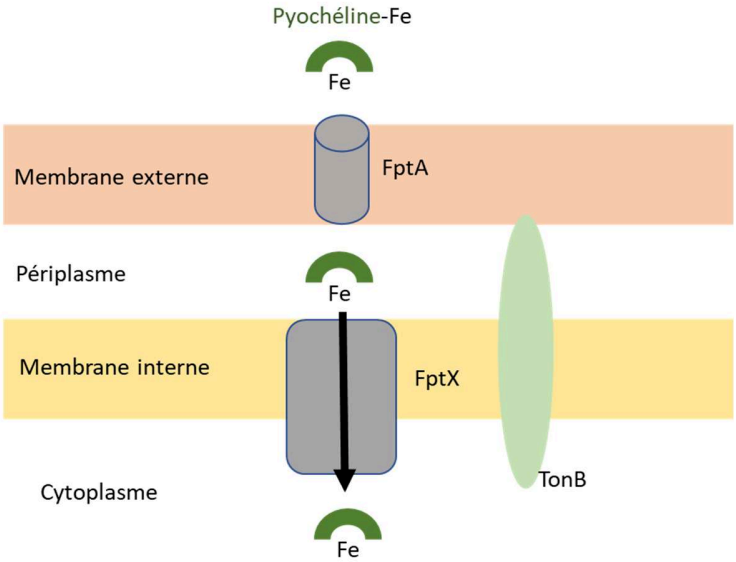


Figure 12. Internalisation du complexe pyochéline-fer (adaptée de (**Mislin & Schalk**, 2014)).

P. aeruginosa est aussi capable d'incorporer le fer sous sa forme Fe^{2+} soluble grâce au système de transport Feo. Les phénazines, dont la pyocyanine qui est synthétisée grâce à PhzS et PhzM à partir de l'acide phénazine-1-carboxylique [Figure 13], sont capables de réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} permettant le transport du fer par ce système Feo (**Wang et al.**, 2011). Le Fe^{2+} diffuse probablement par la membrane externe puis est transporté vers le cytoplasme via le complexe FeoABC, où FeoB est la protéine de membrane contenant un domaine capable d'hydrolyser le GTP (domaine nommé NFeoB) pouvant donner l'énergie nécessaire au transport du fer [Figure 14]. FeoA, est une protéine cytoplasmique dont le rôle est à ce jour inconnu, mais qui pourrait agir avec FeoB. Enfin, FeoC est une petite protéine cytoplasmique dont le rôle reste également inconnu (**Sestok et al.**, 2018).

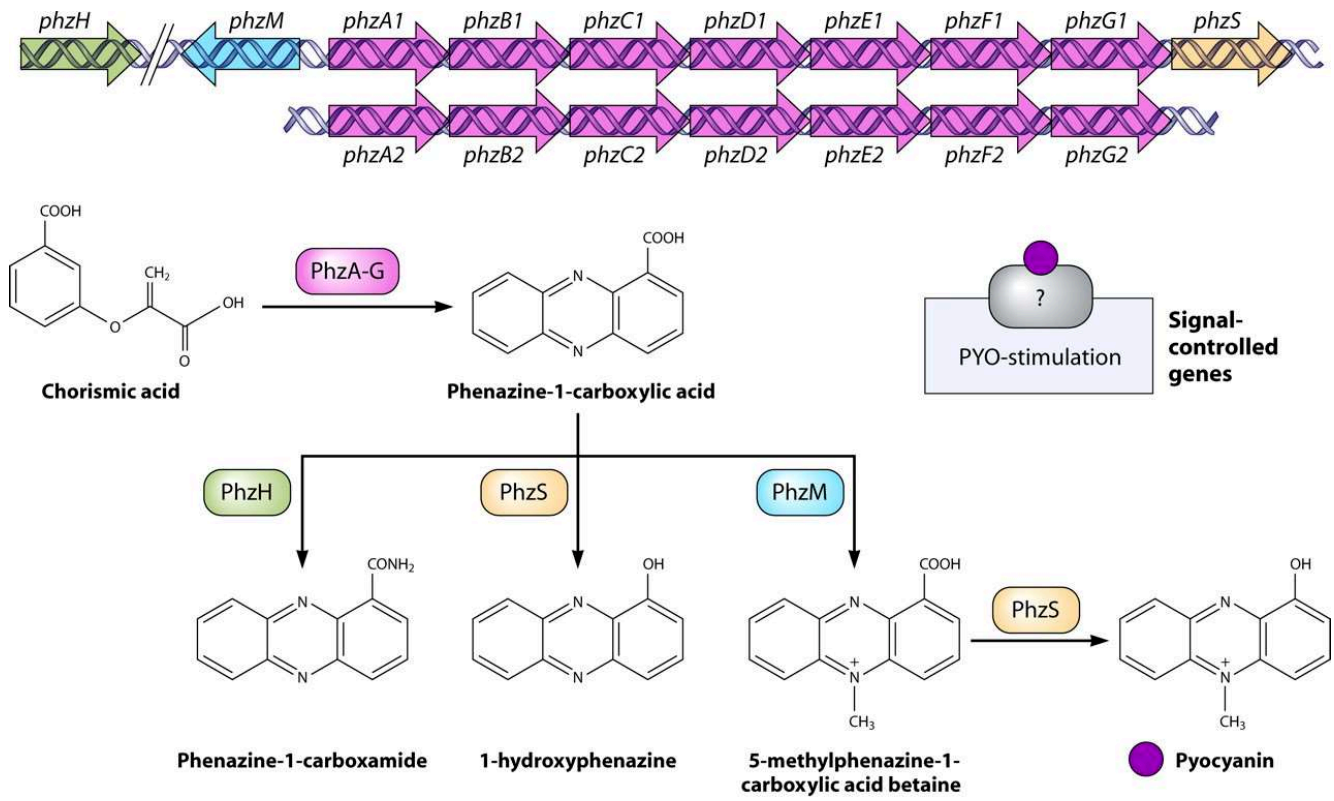


Figure 13. Synthèse des phénazines chez *P. aeruginosa* (**Nadal Jimenez et al.**, 2012)

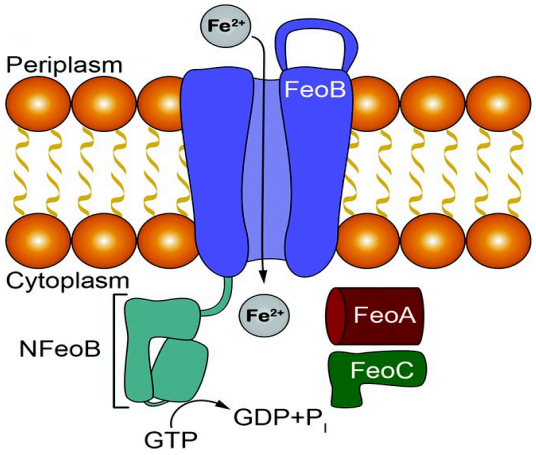


Figure 14. Transport du fer Fe^{2+} par le système FeoABC (**Sestok et al.**, 2018)

En plus de produire ses propres sidérophores, *P. aeruginosa* est capable d'utiliser les sidérophores d'autres bactéries et d'utiliser des récepteurs spécifiques pour en récupérer le fer. C'est le cas de PfeA ou encore de PirA qui sont des récepteurs pour la ferrientérobactine (**Ghysels et al.**, 2005).

La régulation du fer chez *P. aeruginosa* est un système très complexe. Il fait intervenir la protéine régulatrice du fer Fur (Fer Uptake Regulator), ainsi que de nombreux facteurs sigma et des TCS. Fur agit comme un répresseur de gènes impliqués dans l'internalisation du fer, lorsqu'il est fixé au Fe^{2+}. Lorsque la concentration intracellulaire en Fe^{2+} est élevée, le complexe Fur/Fe^{2+} va réguler des gènes de façon directe en se fixant sur leurs régions promotrices, empêchant la fixation de l'ARN polymérase et donc la transcription. Quand la concentration en Fe^{2+} diminue, Fur ne peut plus se fixer sur les régions promotrices, et la transcription de gènes impliqués dans l'import du fer peut s'effectuer. Fur est aussi capable de moduler l'incorporation du fer de façon indirecte par l'intermédiaire de facteurs sigma à fonction extracytoplasmique (facteur sigma ECF), qui vont eux même agir sur leur propre régulon. Parmi ces ECF, PvdS contrôle la transcription de gènes nécessaires pour la virulence, comme *toxA* par exemple. Les ECF impliqués dans la régulation du fer sont au nombre de 14 et Fur peut en réguler 12 [Figure 15] (**Chevalier et al.**, 2019). Fur est aussi capable de réguler la transcription de gènes codant des récepteurs TonB dépendants (**Noinaj et al.**, 2010), ainsi que deux petits ARN régulateurs *prrF1* et *prrF2* (**Oglesby et al.**, 2008).

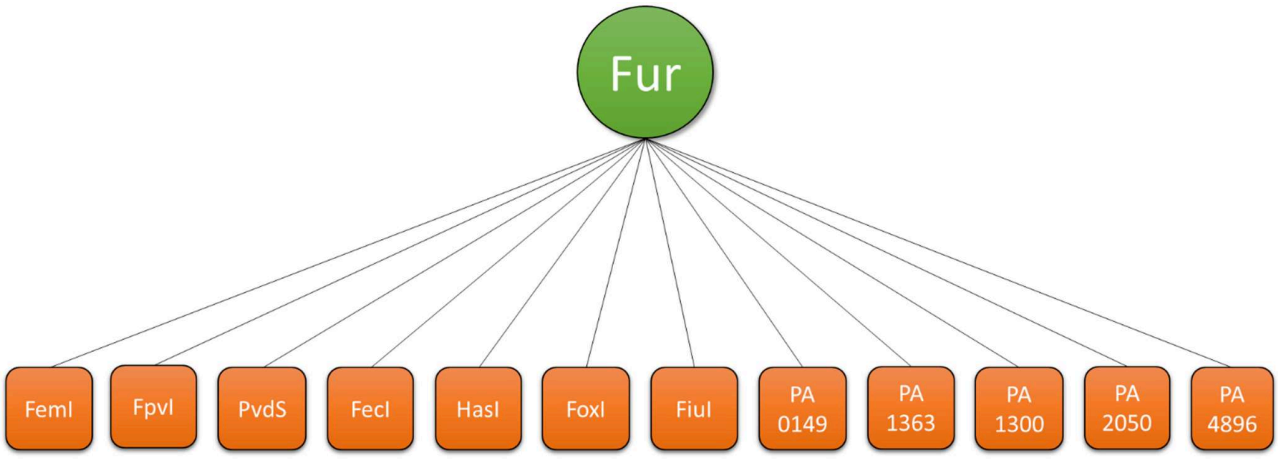


Figure 15. Facteurs sigma extracytoplasmiques régulés par Fur (adaptée de (**Chevalier et al.**, 2019))

B. *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis, coque à Gram positif, a été découvert en 1899 par Thiercelin (**Thiercelin**, 1899). Cette année est aussi associée aux premiers cas de virulence liés aux entérocoques (**Maccallum & Hastings**, 1899). Autrefois regroupés comme Streptocoques du groupe D, c'est en 1984 que Schleifer et Kilpper-Balz classifient ces bactéries en tant qu'Entérocoques (**Schleifer & Kilpper-Balz**, 1984). La plupart des espèces de ce groupe ont la capacité de croître dans des milieux dont le pH peut atteindre 9,6, et un niveau en NaCl à 6,5%, ou encore dans des milieux riches en sels biliaires (40%). Ces bactéries peuvent également survivre à des températures de l'ordre de 60°C pendant 30 minutes, et croître à des températures allant de 10°C à 40°C. *E. faecalis* est une bactérie que l'on retrouve au niveau du microbiote du

tractus gastro-intestinal de l'Homme et des animaux. Grâce à sa capacité à survivre dans des conditions extrêmes, *E. faecalis* peut être présente dans d'autres niches, telles que l'eau, la nourriture, les plantes, à la suite d'une contamination fécale (**Giraffa**, 2002).

Des souches d'*E. faecalis* sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire, notamment comme ferments lactiques dans la fabrication de fromages (**Giraffa et al.**, 1994) en raison de leur capacité à se développer dans des conditions de pH acide et de forte salinité. Elles possèdent des activités protéolytiques et lipolytiques qui contribuent à l'affinage des fromages et à la production d'arômes (**Diaz et al.**, 1995; **Thompson & Marth**, 1986). *E. faecalis* peut aussi être utilisée en tant que probiotique pour l'Homme et dans la nourriture animale, même si cela reste controversé. En effet, *E. faecalis* n'est pas considérée comme ayant le statut GRAS « *generally recognize as safe* » et certaines souches présentent même des risques pour la santé, liés à la présence de facteurs de virulence et sa capacité de transferts de gènes de résistances aux antibiotiques (**Franz et al.**, 2003). *E. faecalis* est une bactérie que l'on retrouve lors d'infection contractée dans des centres de soins. Lors du rapport de l'Institut de Veille Sanitaire de 2012, *E. faecalis* représentait environ 4,6% des germes associés aux infections tandis qu'en 2017 elle en représentait environ 6,5%, se plaçant en 3e position devant *P. aeruginosa*. Elle est responsable d'un nombre important d'infections, comme des bactériémies, des endocardites, ou encore des infections du tractus urinaire (**Malani et al.**, 2002). Certaines souches d'*E. faecalis* sont difficiles à traiter en raison de leur résistance à de nombreux antibiotiques dont la vancomycine (**Leclercq**, 1997).

1. Facteurs de virulence sécrétés

Les facteurs de virulence d'*E. faecalis* lui permettent de coloniser et d'envahir les tissus de l'hôte ainsi que de perméabiliser les cellules épithéliales, afin d'échapper au système immunitaire (**Franz et al.**, 2003).

Parmi les facteurs de virulence pouvant être sécrétés, on peut citer des protéases : la gélatinase codée par le gène *gelE* mais aussi la sérine protéase codée par *sprE,* qui sont situées sur le même opéron, sous la dépendance du système Fsr qui est impliqué dans le QS (**Sifri et al.**, 2002) et dont le fonctionnement sera décrit dans un prochain point. La gélatinase est une métalloprotéase à zinc qui contribue à la virulence par sa capacité à cliver un certain nombre de substrats de l'hôte comme le collagène, la fibrine ou encore le fibrinogène (**Madsen et al.**, 2017). Elle aurait également un rôle important dans la dégradation de protéines de surface ayant un mauvais repliement et pourrait dégrader des phéromones, petits peptides impliqués dans la communication, dans le milieu extracellulaire (**Waters et al.**, 2003). La sérine protéase présente des homologies avec la protéase V8 que l'on peut retrouver chez *S. aureus* (**Sifri et al.**, 2002).

En plus de ces deux molécules, *E. faecalis* est capable de sécréter d'autres facteurs comme la cytolysine. Les gènes codant pour cette toxine sont organisés en opéron, six gènes pour la biosynthèse et deux pour la régulation. L'opéron peut se trouver sur le chromosome ou sur un plasmide répondant à des phéromones (**Van Tyne et al.**, 2013). La toxine est composée de sous-unités, qui vont être maturées grâce à la protéine CylM dans le cytoplasme, puis transporter à l'extérieur par le transporteur CylB. CylA va activer les deux sous-unités, qui vont alors pouvoir s'assembler lors de la présence d'une cellule cible et former des pores dans la membrane. Dans le cas où il n'y a pas de cellule cible, les deux sous-unités vont s'assembler et former un complexe insoluble. La bactérie qui produit cette cytolysine est protégée par la production de la protéine transmembranaire CylI, lui conférant une sorte d'immunité en empêchant celle-ci d'être la cible de sa propre cytolysine (**Van Tyne et al.**, 2013). La cytolysine est aussi capable de lyser les cellules bactériennes, faisant de cette toxine une bactériocine (**Yuen & Ausubel**, 2014).

E. faecalis est également capable de produire d'autres enzymes comme la hyaluronidase qui dégrade l'acide hyaluronique qui compose la matrice extracellulaire des cellules animales et pourrait permettre à la bactérie d'envahir les tissus de l'hôte plus facilement (**Kayaoglu & Ørstavik**, 2004). De plus, une de ses structures cellulaires, l'acide lipotéichoïque serait impliqué dans divers phénomènes dont l'adhésion aux cellules eucaryotes comme les lymphocytes, les érythrocytes et les cellules épithéliales. Il peut aussi stimuler la production de cytokines, comme

l'Interleukine-1β (IL) ou l'IL-8, provoquant une inflammation et participe, de plus, à la formation de biofilm chez *E. faecalis* (**Kayaoglu & Ørstavik**, 2004).

Enfin, les phéromones sexuelles qui sont impliquées dans le QS peuvent aussi être considérées comme facteurs de virulence et seront détaillées dans la partie « *Quorum-sensing* chez *E. faecalis* ».

2. Biofilm d'*E. faecalis*

La formation de biofilm chez *E. faecalis* requiert quatre étapes, l'attachement initial à une surface, la formation de microcolonies, dont peu de choses sont connues, la maturation du biofilm et enfin la dispersion pour revenir à un état planctonique [Figure 16].

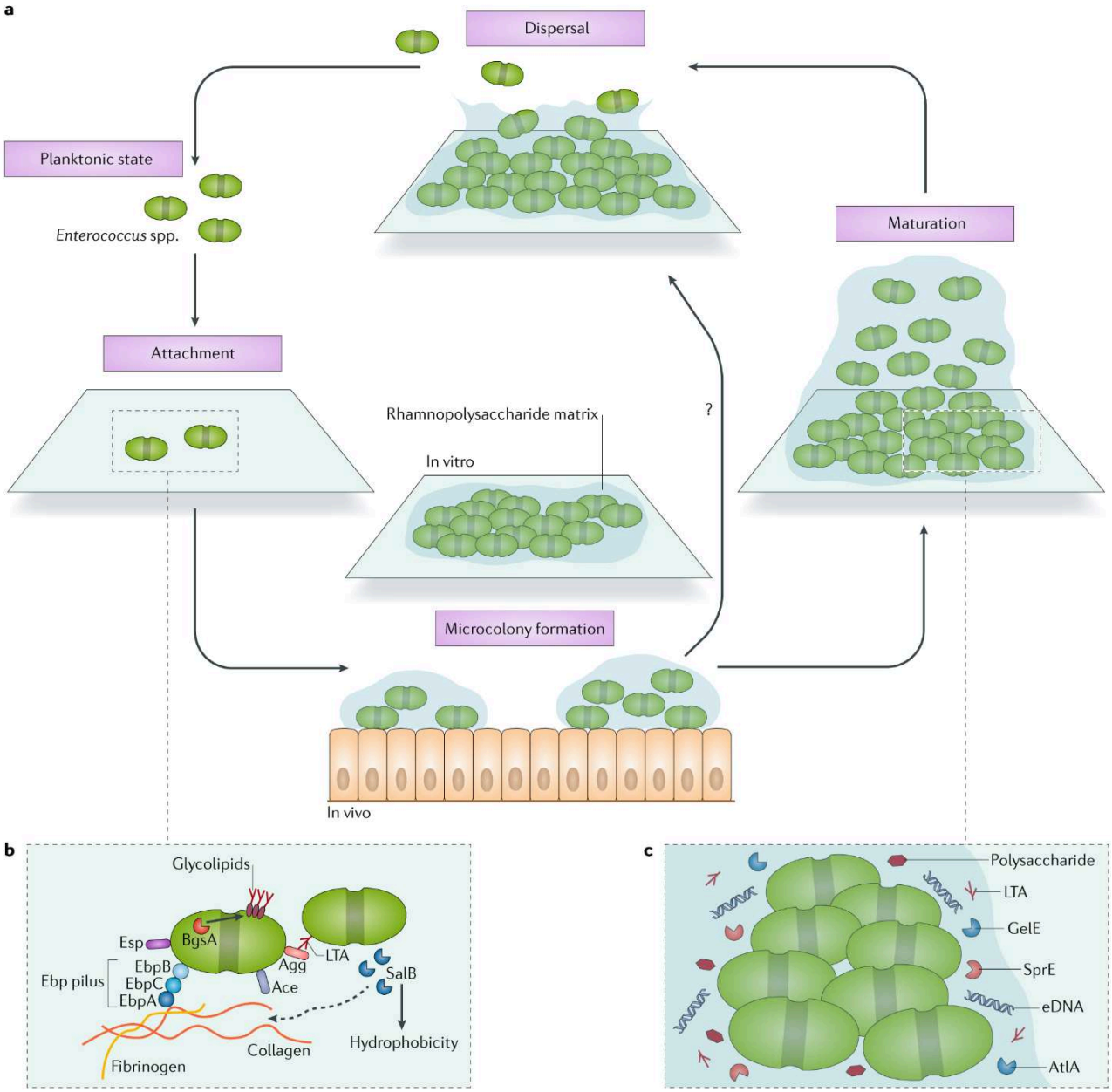


Figure 16. Formation du biofilm chez *E. faecalis* (**Ch'ng et al.**, 2019)

I. Pathogènes opportunistes

Chez *E. faecalis*, de nombreux éléments rentrent en jeu lors de l'étape d'adhésion à une surface. Ces éléments peuvent être regroupés sous le terme d'adhésines.

Un de ces éléments, nécessaire pour l'adhésion, est une structure associée à la paroi de la bactérie : le pilus nommé Ebp (Endocarditis and biofilm-associated pilus). Les gènes codant pour ce pilus sont *ebpA*, *ebpB*, *ebpC* et un gène associé *srtC*. Ces gènes sont organisés en opéron. Un mutant *ebpABC*, voit sa capacité à se fixer au collagène, ou au fibrinogène réduite, diminuant l'attachement initial et donc par conséquent altérant la formation de biofilm (**Nallapareddy et al.**, 2006).

La substance d'agrégation (AS) est le nom donné à un groupe de protéines de surface, impliquées dans l'agrégation des bactéries entre elles et dans l'adhésion. Ces protéines sont codées par des plasmides conjugatifs inductibles par les phéromones. Parmi les AS d'*E. faecalis*, les trois plus étudiées sont Asp1, Asc10 et Asa1, qui appartiennent respectivement aux plasmides conjugatifs pPD1, pCF10 et pAD1. Les substances d'agrégation possèdent un domaine de fixation à l'acide lipotéichoïque qui leur permet de se lier à d'autres bactéries, et deux motifs RGD, qui seraient importants pour l'interaction avec les cellules eucaryotes. De plus, le rapprochement des bactéries entre-elles leur permet de transférer à plus haute fréquence des plasmides contenant des gènes de virulence (**Foulquié Moreno et al.**, 2006; **Hendrickx et al.**, 2009). Les substances agrégatives augmenteraient aussi l'hydrophobicité à la surface de la bactérie (**Hirt et al.**, 2000).

Une autre adhésine impliquée dans la liaison au collagène appelée ACE (Adhesin to collagen of *Enterococcus*), ancrée à la membrane, est essentielle pour adhérer aux cellules eucaryotes qui contiennent du collagène comme c'est le cas au niveau des valves cardiaques et des tissus aortiques (**Singh et al.**, 2010). Cette adhésine sert également pour adhérer à la laminine et la dentine et son absence réduit la colonisation lors d'une endocardite chez le rat (**Ch'ng et al.**, 2019).

Esp (*Enterococcus surface Protein*), est une protéine de surface extracellulaire qui a été décrite pour la première fois dans la souche clinique d'*E. faecalis* MMH594 (**Shankar et al.**, 1999). Esp est codée par un gène se trouvant sur un îlot de pathogénicité qui n'est pas présent chez toutes les souches. L'expression de ce gène permettrait d'augmenter l'hydrophobicité à la surface

de la cellule bactérienne et serait donc essentiel pour l'adhésion sur des surfaces polystyrènes (**Tendolkar et al.**, 2004). La protéine Esp n'est pas requise pour former un biofilm chez des souches d'*E. faecalis*, cependant en sa présence la formation de biofilm est plus importante, le rôle exact joué par cette protéine reste encore à explorer (**Kristich et al.**, 2004).

Lors de cette première étape de formation du biofilm, des glycolipides ancrés à la membrane, vont être importants pour former un biofilm sur des surfaces plastiques. Une étude menée par Theilacker et al., a mis en évidence qu'un mutant du gène *bgsA*, codant pour une glucosyltransférase associée à la synthèse de glycolipides, ne pouvait plus former de biofilm sur des surfaces plastiques (**Theilacker et al.**, 2009). De plus, les auteurs ont montré que ce mutant ne pouvait plus adhérer de façon normale aux cellules épithéliales et que la synthèse d'un des glycolipides membranaires les plus abondants l'α-diglycosyl-diacylglycerol (DGlc-DAG) était aboli, provoquant une diminution de l'accumulation de bactéries au sein du biofilm (**Theilacker et al.**, 2009). Ils ont aussi montré, lors de cette étude, qu'une bactériémie, déclenchée avec le mutant *bgsA*, durait moins longtemps qu'avec le sauvage.

Enfin, il existe une autre molécule permettant l'adhésion aux surfaces : SalB. Celle-ci est une protéine ayant de nombreuses homologies avec SagA d'*E. faecium*. Son absence chez *E. faecalis* entraine une modification de la morphologie cellulaire, suggérant un rôle dans le métabolisme du peptidoglycane. SalB appartient à une famille de protéines, incluant SagA d'*E. faecium* et PcsB de différentes espèces de Streptocoques, dont le rôle serait celui d'une peptidoglycane hydrolase (**Djorić & Kristich**, 2017). Mohamed et al., ont montré qu'un mutant *salB* produisait moins de biofilm que le sauvage, et ont émis l'hypothèse que l'absence de *salB*, diminuerait l'hydrophobicité de la bactérie (**Mohamed et al.**, 2006).

La deuxième étape qui consiste en une maturation du biofilm par la formation d'une matrice et la formation de microcolonies est moins bien connue. On peut cependant noter le rôle de l'opéron *epa* durant cette étape. En effet, le cluster *epa* regroupe 18 gènes qui sont impliqués dans la formation d'un rhamnopolysaccharide nommé Epa. Un mutant *epaOX* montre une réduction de l'intégrité de la résistance du biofilm, facilement détachable lors d'un lavage,

contrairement à la souche sauvage (**Ch'ng et al.**, 2019). Cet opéron serait aussi impliqué dans la résistance aux antibiotiques associée aux biofilms, puisque le biofilm d'un mutant *epaQ* est plus sensible à la daptomycine que la souche sauvage (**Korir et al.**, 2019).

Un biofilm mature nécessite une matrice composée d'ADNe, de polysaccharides mais également de protéases extracellulaires et fait aussi intervenir l'acide lipoteichoïque. L'élément le mieux caractérisé de la matrice du biofilm d'*E. faecalis* est l'ADNe. Cet ADNe est libéré de façon indépendante de la lyse cellulaire (**Barnes et al.**, 2012) et permet de structurer le biofilm d'*E. faecalis*. Cette sécrétion d'ADNe pourrait être liée à l'autolysine AtlA et aux protéines extracellulaires GelE et SprE. En effet, un mutant *atlA* induit un retard de la libération d'ADNe ainsi qu'une diminution de la formation de biofilm (**Guiton et al.**, 2009), tandis que GelE et SprE interagiraient et réguleraient AtlA pour relarguer de l'ADNe dans la matrice (**Thomas et al.**, 2009). MprF (multiple peptide resistance factor) serait aussi impliqué dans la régulation de la libération de l'ADNe, un mutant *mprf2* relargue en effet plus d'ADNe que la souche sauvage ou le mutant *mprf1* (**Bao et al.**, 2012). L'opéron *dtlABCD* permet la production de D-alanine ester au niveau des acides lipoteichoïques. Lorsque cet opéron est muté, donc en absence de D-alanine, il y a diminution de la formation de biofilm et d'adhérence aux surfaces, notamment due aux charges négatives à la surface de la bactérie (**Fabretti et al.**, 2006). BopD, (*Biofilm on plastic*), régulateur transcriptionnel pouvant fixer un sucre, contribue aussi à la formation de biofilm (**Hufnagel et al.**, 2004).

L'étape de dispersion du biofilm chez *E. faecalis* est un phénomène mal connu. Cependant, Rossmann et al., ont démontré que l'induction d'un prophage conduisait à une dispersion du biofilm chez *E. faecalis* V583ABC (**Rossmann et al.**, 2015). L'ajout de l'autoinducteur 2, permet une surexpression des gènes du prophage 5 qui sont impliqués dans la lyse cellulaire, résultant en une diminution de la formation de biofilm chez cette souche ou bien une dispersion sur des biofilms préformés (**Rossmann et al.**, 2015).

De nombreux éléments intervenant dans la formation de biofilm sont régulés par le système de QS *fsr*. C'est par exemple le cas de *gelE* et *sprE* qui sont régulés par le régulateur transcriptionnel FsrA.

3. *Quorum-sensing* chez *E. faecalis*

Chez les bactéries à Gram positif, de nombreux processus sont contrôlés par le QS. Les molécules signal ne sont pas des AHL comme vu précédemment pour les bactéries à Gram négatif, mais des phéromones constituées de peptides ou peptides modifiés.

Chez *E. faecalis,* plusieurs phéromones peuvent agir en tant que molécules signal afin d'activer la transcription de certains gènes impliqués dans la virulence de la bactérie ou bien dans la formation de biofilm et participent aussi dans le transfert de plasmides conjugatifs. Ces phéromones sont des petits peptides hydrophobes de 7 à 8 acides aminés sécrétés dans le milieu extracellulaire par l'intermédiaire de transporteurs ABC et qui fonctionnent comme des peptides signaux. La fréquence de transfert de plasmides conjugatifs peut être fortement augmentée en présence de ces phéromones sexuelles (**Clewell & Dunny**, 2002; **Kayaoglu & Ørstavik**, 2004). Une des souches va sécréter dans le milieu une phéromone correspondant au plasmide qu'elle ne possède pas. En réponse, la souche donneuse va produire une substance d'agrégation qui va permettre le contact entre la souche receveuse et donneuse, facilitant l'échange. Une fois la copie du plasmide acquise la production de phéromone stoppe mais la souche peut toujours continuer à sécréter d'autres phéromones, pour acquérir d'autres plasmides (**Dunny et al.**, 1978). De nombreux plasmides chez cette bactérie sont inductibles par la quantité de phéromones sexuelles détectée dans le milieu extracellulaire. Lorsqu'il y a accumulation, ces phéromones sont reconnues par un senseur, entrainant la transcription de gènes codant pour la gélatinase ou bien la cytolysine qui a pour autoinducteur $CylL_S$.

Dans le cas de la cytolysine, et en présence d'une cellule cible il existe deux possibilités : une partie des toxines CylLl, qui ont une plus grande affinité pour la cellule cible, va se fixer sur celle-ci, laissant la toxine CylLs s'accumuler sous une forme libre. En atteignant une certaine concentration, CylLs va pouvoir se fixer sur la protéine membranaire CylR1, perturbant l'interaction du répresseur CylR2 sur la région promotrice P_L, conduisant finalement ainsi à l'expression de l'opéron. L'autre partie des toxines CylLl va s'assembler avec CylLs pour former des pores dans la membrane de la cellule cible [Figure 17] (**Ali et al.**, 2017; **Haas et al.**, 2002).

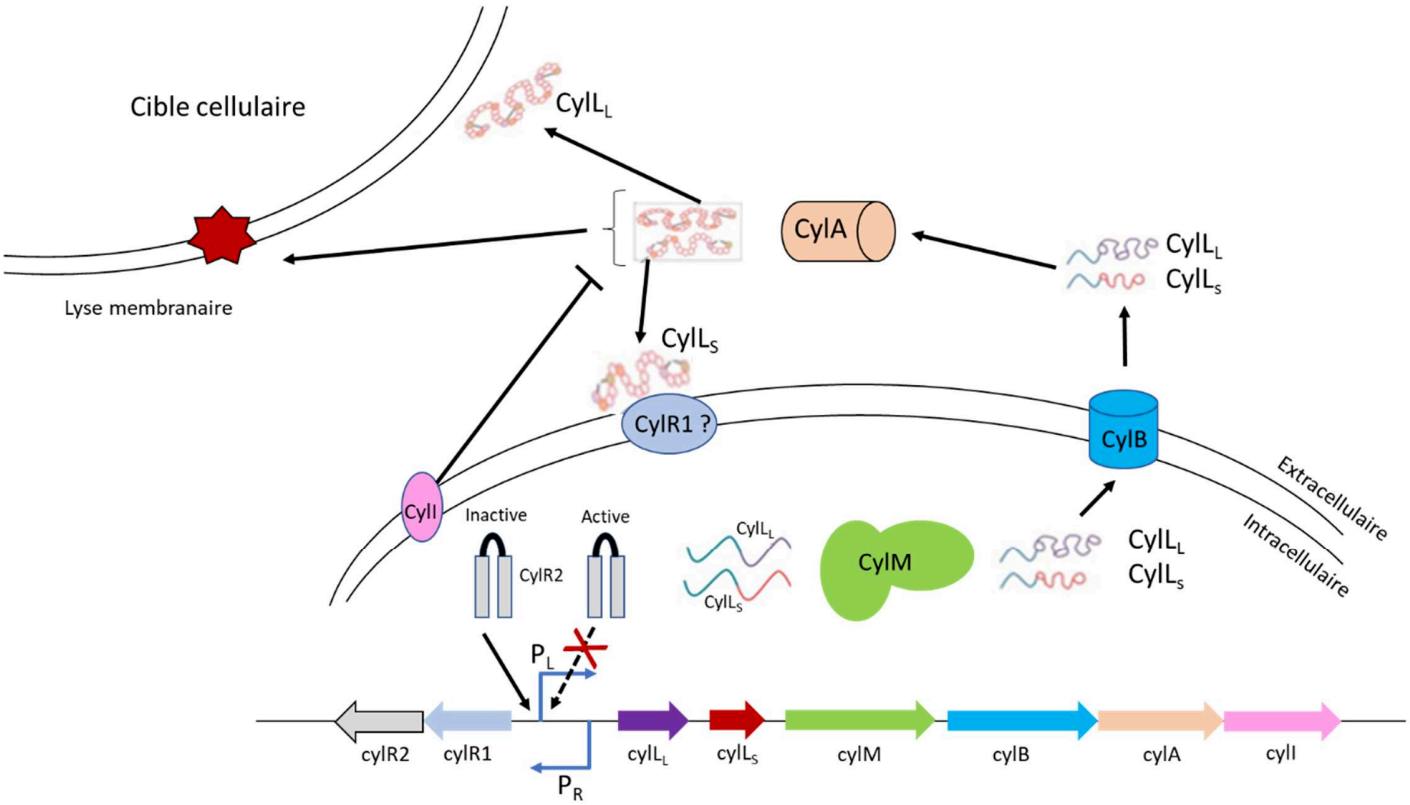


Figure 17. Fonctionnement de l'opéron cytolysine sous influence du QS (Adaptée de (**Ali et al.**, 2017))

Le locus *fsr* est responsable, chez *E. faecalis,* de la production d'un TCS, permettant de ressentir la densité cellulaire et de réguler certains gènes de virulence. Ce locus est composé de quatre gènes : *fsrA, fsrB, fsrC* et *fsrD* et quatre autres gènes sont sous la dépendance directe de

ce système : *gelE, sprE, ef1097* et *ef1097b*. Le gène *fsrA*, code pour la protéine FsrA qui est le régulateur de réponse du système Fsr. La transcription de *fsrA* est sous la dépendance d'un autre régulateur transcriptionnel. Le senseur de ce système FsrC peut répondre à la présence du peptide GBAP (Gelatinase biosynthesis-activating pheromone), qui s'est accumulé dans le milieu extracellulaire. Le gène *fsrB* code pour une protéine transmembranaire faisant partie de la famille des protéines B régulatrices de gènes accessoires (AgrB). Cette protéine FsrB permet de maturer le pro-peptide FsrD pour en générer la molécule GBAP, qui se compose d'un cycle lactone contenant 11 résidus d'acides aminés. Le gène *ef1097*, code pour une pré-proprotéine qui est transportée à travers le système de transport Sec et est clivée par la gélatinase (GelE) pour former l'entérocine O16 [Figure 18] (**Ali et al.**, 2017).

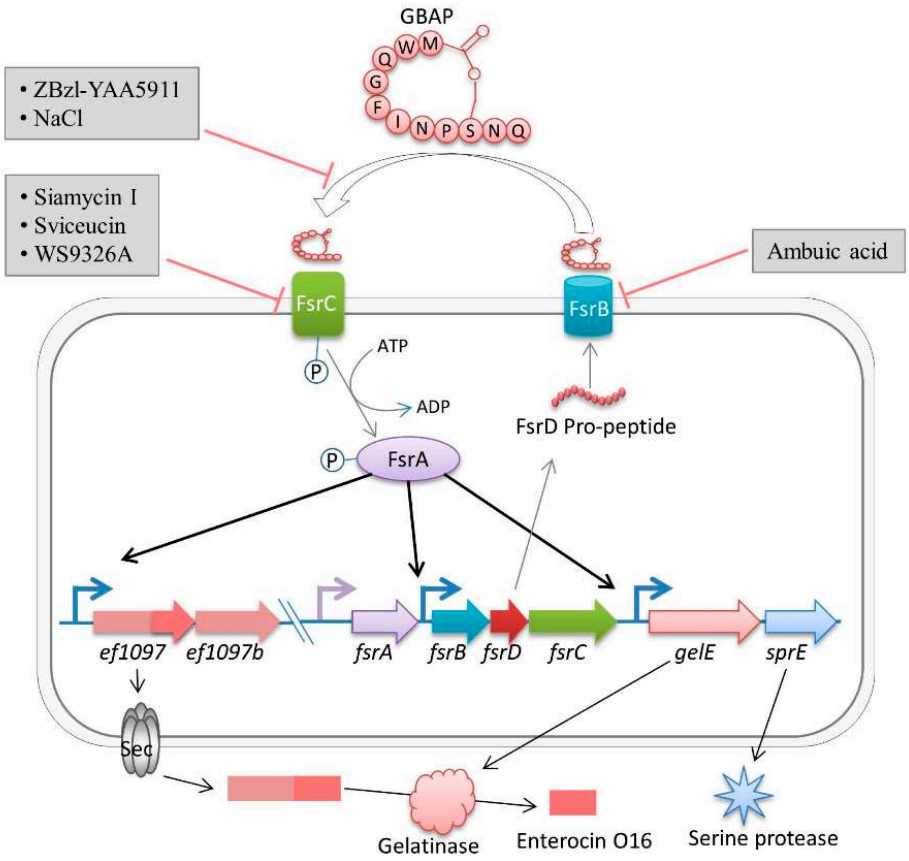


Figure 18. Système Fsr chez *E. faecalis* (**Ali et al.**, 2017)

4. Systèmes à deux composants

D'après Hancock et al, il existerait 17 TCS chez la souche *E. faecalis* V583 (**Hancock & Perego**, 2002) [Tableau 1].

Tableau 1. Systèmes TCS chez *E. faecalis* (Histidine kinase HK, Régulateur de réponse RR) (**Hancock & Perego**, 2002).

	Senseur HK	Régulateur de Réponse RR
HK-RR 01	EF2219	EF2218
HK-RR 02	EF3197	EF3196
HK-RR 03	EF2912	EF2911
HK-RR 04	EF1704	EF1703
HK-RR 05 (CroSR)	EF3290	EF3289
HK-RR 06	EF1261	EF1260
HK-RR 07 (VicKR)	EF1194	EF1193
HK-RR 08	EF1863	EF1864
HK-RR 09	EF0927	EF0926
HK-RR 10	EF1051	EF1050
HK-RR 11	EF2298	EF2299
HK-RR 12	EF0570	EF0571
HK-RR 13	EF0373	EF0372
HK-RR 14	EF1209	EF1210
HK-RR 15 (FsrAC)	EF1820	EF1822
HK-RR 16	EF1335	EF1336
HK-RR 17	EF1632	EF1633

Un des TCS a déjà été décrit précédemment (§ I.B.3), le système Fsr (HK-RR15), impliqué dans le QS et la transcription de *sprE* et *gelE*. D'autres systèmes permettent de répondre à différents stimuli, tels qu'un stress de paroi, provoqué par des antibiotiques par exemple, c'est le cas de CroSR (HK-RR05), qui permet de répondre à la présence d'antibiotiques comme les glycopeptides ou encore la céphalosporine (**Kellogg & Kristich**, 2016).

Le système HK-RR11, correspondrait à un TCS impliqué dans la résistance à un autre antibiotique, la vancomycine (**Evers & Courvalin**, 1996). Des recherches de similarité ainsi que l'utilisation d'un mutant du régulateur de réponse du système HK-RR07, VicKR, révèle qu'il

pourrait appartenir à la sous-famille YycFG/Vic, qui semble être important pour la viabilité cellulaire (**Hancock & Perego**, 2002). Le signal de ce système n'a pas encore été identifié mais il pourrait s'agir d'un signal rédox (**Ng & Winkler**, 2004). D'autres systèmes, parmi les 17, sont impliqués dans la virulence lors de l'utilisation d'un modèle d'infection : EF1704-1703 (HK-RR04), EF3290-3289 (HK-RR05), EF1261-1260 (HK-RR06) et le système EF1051-1050 (HK-RR10) (**Muller et al.**, 2007; **Teng et al.**, 2002). Le système HK-RR02 semble avoir une grande homologie avec le système LytSR de *S. aureus* et serait impliqué dans l'intégrité de la paroi cellulaire (**Brunskill & Bayles**, 1996).

Certains systèmes sont encore peu connus, tout comme les signaux entrainant la cascade de régulation, de même que le mécanisme moléculaire impliqué dans certains TCS d'*E. faecalis*.

II. Endocrinologie microbienne

A. Histoire et découverte

Le corps humain est un organisme complexe, constitué de milliards de cellules. Chacune de ces cellules joue un rôle bien précis pour le bon fonctionnement de l'organisme. De façon surprenante, les cellules procaryotes, également présentes au sein du corps humain, semblent être en quantité à peu près égale, ou légèrement supérieure à nos cellules eucaryotes. Dans un premier temps, il a d'abord été évalué que les bactéries étaient 10 fois plus nombreuses que les cellules eucaryotes (ratio de 10:1) (**Henderson & Wilson**, 1996), or une étude récente a ramené ce ratio proche de 1:1 (**Sender et al.**, 2016). Afin de fonctionner correctement, les cellules eucaryotes vont devoir communiquer sur de courtes ou longues distances au sein du corps humain. De nombreuses molécules leur permettent d'échanger et de s'adapter à de nouvelles conditions. Parmi ces différents effecteurs : des cytokines, des hormones ou des neurotransmetteurs.

Les cellules procaryotes, présentes de façon permanente (microbiote commensal) ou transitoire au sein du corps humain, sont à même de ressentir ces différents signaux émis par les cellules eucaryotes. Les premières évidences de ces interactions hôtes/microorganismes, notamment concernant les pathogènes, remontent à plusieurs décennies. En effet, c'est en 1930 que Renaud et Miget ont rapporté le premier cas d'une personne ayant contracté un sepsis associé à la présence d'épinéphrine (adrénaline) (**Renaud & Miget**, 1930). La seringue utilisée pour traiter le patient fut mal stérilisée et des spores de *Clostridium perfringens* étaient encore présentes lors de l'injection de la molécule, provoquant, par la suite, une gangrène gazeuse. Un cas similaire a également été décrit par Cooper en 1946 (**Cooper**, 1946) suivi, quelques années plus tard par des essais visant à comprendre le rôle de cette hormone sur l'établissement d'une infection bactérienne (**Evans et al.**, 1948). Pour cela, des cultures avec épinéphrine ou avec eau physiologique (témoin) ont été administrées à des cochons d'Inde, dont les tissus étaient par la suite récupérés pour rechercher la croissance bactérienne. Les résultats de cette étude ont

montré que la prolifération bactérienne était bien plus importante en présence d'épinéphrine, comparée au témoin. Ce n'est qu'en 1991 que Lyte et Ersnt ont décidé d'évaluer l'effet des catécholamines sur la croissance des bactéries (**Lyte & Ernst**, 1991). Des pathogènes à Gram négatif tels qu'*E. coli*, *P. aeruginosa* ou encore *Yersinia enterocolitica* ont été utilisés pour cette expérience et tous ont vu leur croissance augmenter en présence de ces molécules. Quelques années plus tard, l'étude a été étendue à d'autres bactéries (**Freestone et al.**, 1999) dont *Klebsiella pneumoniae* et certaines bactéries à Gram positif comme *E. faecalis*, *Listeria monocytogenes* ou encore *S. aureus*. Faisant suite à ces différents travaux, un nouveau domaine a vu le jour, celui de l'endocrinologie microbienne, qui étudie l'influence des molécules sécrétées par le corps humain sur les bactéries.

Depuis lors, de nombreuses études concernant l'effet des substances sécrétées par l'organisme sur les bactéries ont été effectuées. La production de ces différentes molécules est modulée par des facteurs environnementaux, tels que notre alimentation, la pratique d'une activité physique ou bien notre niveau de stress [Figure 19]. En réponse à ces changements endocrinologiques, certaines bactéries de notre microbiote vont pouvoir moduler différents aspects de leur physiologie, tels que leur croissance ou encore leur virulence.

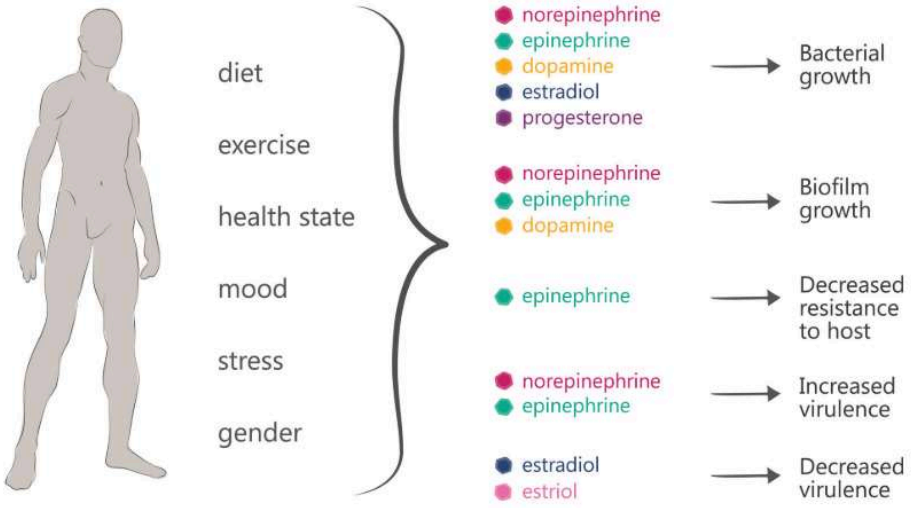


Figure 19. Effets de l'hôte sur le microbiote. Une multitude de facteurs (l'alimentation, l'activité physique, l'humeur, le stress, l'état de santé) conduit à une altération des niveaux hormonaux, qui induit à son tour de nombreux effets sur le microbiote (**Neuman et al.**, 2015).

B. Cytokines

Pour se défendre, le corps humain a mis au point un arsenal de molécules pouvant combattre tous types d'agressions extérieures. Pour y répondre au mieux, une bonne communication entre cellules est essentielle. Ce sont des molécules de signalisation, appelées cytokines, qui jouent le rôle de régulateurs du système immunitaire. Ces cytokines sont des petits peptides solubles produits par un nombre varié de cellules et agissant sur une multitude d'autres grâce à des récepteurs. Elles vont intervenir dans diverses fonctions biologiques, telles que les réactions inflammatoires, les réactions immunitaires, mais aussi au niveau de l'hématopoïèse.

En 1991, une étude sur plusieurs souches d'*E. coli* a mis en évidence l'effet de l'IL–1β sur la croissance de cette bactérie (**Porat et al.**, 1991). Parmi les souches traitées, seules celles qui étaient virulentes pour l'Homme ont vu leur croissance augmenter avec l'interleukine-1. De plus,

lors de cette étude, les auteurs ont réussi à mettre en évidence un récepteur putatif à l'interleukine-1 chez *E. coli*. En effet, l'utilisation d'un antagoniste du récepteur de l'IL-1, l'IL-1 *receptor antagonist* (IL-1ra), a supprimé l'induction de la croissance chez les souches virulentes. La recherche de senseur pour cette interleukine a ensuite été approfondie chez *Yersinia pestis* dans les années 90, et c'est la protéine Caf1A (capsule antigen F1 assembly) qui a été proposée comme cible de l'IL-1β (**Zav'yalov et al.**, 1995). L'IL-1β induit également une augmentation de la croissance chez *Acinetobacter spp*. (**Meduri et al.**, 1999) et chez *S. aureus* (**Meduri et al.**, 1999; **McLaughlin & Hoogewerf**, 2006). Durant l'année 1991, une autre équipe a montré un effet croissance, de l'interleukine-2 cette fois-ci, sur des souches d'*E. coli* virulentes (**Denis et al.**, 1991). L'interleukine-6 est aussi connue pour promouvoir la croissance de mycobactéries (**Denis & Gregg**, 1991) mais aussi de *P. aeruginosa* (**Meduri et al.**, 1999). D'autres molécules du système immunitaire, comme l'interféron-γ (IFN-γ) induisent chez *P. aeruginosa* une production plus importante d'adhésine, la PA-I lectin, plus connue sous le nom de *lecA* (**Wu et al.**, 2005). D'après cette étude, l'IFN-γ se lie sur la protéine membranaire majoritaire de *P. aeruginosa*, appelée OprF. Cette liaison va provoquer des modifications dans la production de molécules impliquées dans la communication bactérienne de type QS ; celles-ci vont par la suite réguler certains gènes de virulence dont *lecA,* qui est notamment impliqué dans la cytotoxicité envers les cellules eucaryotes. Chez *Shigella flexneri*, une étude a montré que la bactérie était capable de se lier au TNF-α (facteur de nécrose tumorale) et de moduler sa capacité d'invasion envers la lignée cellulaire HeLa (cellules immortelles provenant de métastases au niveau du col de l'utérus) (**Luo et al.**, 1993).

C. Hormones

Les hormones sont des substances synthétisées par des cellules spécialisées appelées cellules endocrines et qui sont sécrétées dans le sang. On distingue différents types d'hormones classées selon leur nature chimique, on trouve notamment les hormones peptidiques, les

hormones stéroïdiennes et les hormones dérivées d'amine (incluant les catécholamines qui seront développées dans le chapitre suivant).

1. Hormones peptidiques

La gastrine est une hormone peptidique ayant un rôle important dans le fonctionnement du tractus gastro-intestinal. Elle est produite en tant que pro-hormone (hormone non active) par les cellules G de la muqueuse de l'estomac. Cette gastrine est réduite en petits peptides actifs, dont le plus abondant est le G17, composé de 17 acides aminés (**Calam et al.**, 1980). Elle permet, entre autres, la sécrétion d'acide dans l'estomac. En 1999, une équipe s'est intéressée à l'effet que pouvait avoir cette molécule sur un pathogène que l'on peut retrouver au niveau de l'estomac : *Helicobacter pylori*. L'étude a montré que ce peptide permettait une stimulation importante de la croissance, et cela, de façon dose-dépendante (**Chowers et al.**, 1999). L'utilisation de ligand agoniste (la pentagastrine et la cholécystokinine) se fixant sur le même récepteur que celui de la gastrine chez l'Homme, a bloqué l'incorporation de la gastrine chez *H. pylori,* sans induire d'augmentation de la croissance. Ceci montre l'effet spécifique de l'hormone G17 sur cette bactérie. Toujours, concernant *H. pylori*, une autre équipe a démontré l'effet inhibiteur de la somatostatine (molécule permettant de réguler, notamment, la sécrétion de gastrine (**Bloom & Polak**, 1987)) sur la croissance de la bactérie (**Yamashita et al.**, 1998). Wood *et al.,* se sont, quant à eux, intéressés à l'effet de l'insuline sur le pathogène *Burkholderia pseudomallei*, agent responsable de la mélioïdose. Une part importante des personnes atteintes de cette maladie, présente aussi un diabète, ce qui a poussé Woods et son équipe à étudier l'impact de l'insuline sur *B. pseudomallei*. Ils ont alors mis en évidence un effet inhibiteur de la molécule sur la croissance de cette bactérie, ainsi qu'une liaison spécifique de l'insuline sur *B. pseudomallei* (**Woods et al.**, 1993). L'insuline n'affectait cependant pas la croissance d'autres bactéries telles que *P. aeruginosa*, *E. coli* ou encore *Burkholderia cepacia*. Une étude parue en 2012, a montré que les patients atteints de diabète de type 2 présentaient des compositions différentes de leur microbiote intestinal par rapport de ceux de personnes saines (**Qin et al.**,

2012). Certaines espèces bactériennes pouvant en effet, être plus ou moins présentes, en fonction du taux d'insuline (**Karlsson et al.**, 2013). Parmi les autres hormones impliquées dans l'appétit et le métabolisme, on retrouve la ghréline, hormone sécrétée avant la prise alimentaire, elle stimule l'appétit et son taux diminue pendant le repas. Une équipe a pu démontrer que la ghréline avait un effet antibactérien sur les bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*) mais peu, voire aucun effet sur *E. faecalis* et *S. aureus* (**Min et al.**, 2012). Une autre hormone, l'hormone corticotrope ou adrénocorticotrophine (ACTH), stimule la glande corticosurrénale, permettant la libération de stéroïdes, assurant notamment la gestion du stress via la sécrétion de stéroïdes et de catécholamines. Lors d'une étude en 1970, menée par Gross et Colmano, l'injection d'ACTH chez des poulets leur a permis de mieux résister à des infections provoquées par *E. coli* (**Gross & Colmano**, 1970). Cette substance semble permettre une accumulation plus importante de *Vibrio splendidus* au sein des huîtres, et augmenter la mortalité de ces dernières (**Lacoste et al.**, 2001). De nombreuses autres molécules peuvent avoir des effets antibactériens, c'est notamment le cas des chromogranines A et B qui peuvent ralentir la croissance bactérienne de *Micrococcus luteus* ainsi que celle d'*E. coli,* et voire, complètement inhiber leur croissance à une concentration de 1,5 µM pour la chromogranine A et 1,8 µM pour la B (**Metz-Boutigue et al.**, 1998). Enfin, les peptides natriurétiques qui sont au nombre de trois, le facteur natriurétique cérébrale (BNP pour *Brain natriuretic peptide*), le facteur natriurétique auriculaire (ANF pour *Atrial natriuretic factor*) et le facteur natriurétique de type C (CNP pour *C-type natriuretic peptide*) peuvent influencer la physiologie bactérienne. En effet, le BNP, par exemple, peut avoir une activité antibactérienne contre *P. aeruginosa* ou *Staphylococcus carnosus* (**Krause et al.**, 2001), le CNP, quant à lui, peut former des pores dans des membranes reconstituées, renforçant le côté antibactérien qu'on lui avait attribué. Au contraire, il a été aussi montré par ailleurs, que le CNP augmente considérablement la concentration intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) chez *P. aeruginosa* (**Veron et al.**, 2008), et favorise le caractère virulent de ce pathogène.

II. Endocrinologie microbienne

2. Hormones stéroïdiennes

Même si l'endocrinologie microbienne s'est beaucoup développée ces dernières années, peu d'études concernant les hormones stéroïdiennes ont été réalisées. Cependant, en 2013, Beury-Cirou *et al.*, ont mis en évidence que des hormones sexuelles humaines diminuaient l'accumulation d'AHL chez *P. aeruginosa,* ainsi que l'expression de gènes impliqués dans la régulation du QS (**Beury-Cirou et al.**, 2013). La présence d'œstradiol a conduit à une augmentation de la production d'alginate chez une souche de *P. aeruginosa,* isolée d'une patiente atteinte de mucoviscidose (**Chotirmall et al.**, 2012). Chez la levure *Candida albicans*, l'œstrogène a permis une stimulation de la croissance ainsi qu'une augmentation de son pouvoir infectieux (**White & Larsen**, 1997), la progestérone, quant à elle, induit une surexpression de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et dans la pathogénicité de *C. albicans* (**Banerjee et al.**, 2007). Cependant, il a été montré aussi que la progestérone peut, au contraire, inhiber la croissance de *Neisseria gonorrhoeae* et *N. meningitidis*. La progestérone peut être bactéricide ou bactériostatique envers *N. gonorrhoeae*, selon sa concentration (**Morse & Fitzgerald**, 1974).

D. Neurotransmetteurs

D'autres études ont été effectuées sur les neurotransmetteurs, composés chimiques libérés par les neurones et agissant sur d'autres neurones. Parmi eux, l'acide γ-aminobutyrique (GABA), neurotransmetteur inhibiteur très important du système nerveux chez l'Homme et les animaux. Cette molécule est également libérée en grande quantité lors d'une blessure chez la plante. Il a été montré que le GABA pouvait diminuer *in fine* la virulence d'*Agrobacterium tumefaciens* par modification de son QS (**Chevrot et al.**, 2006). La communication bactérienne chez *P. aeruginosa* est également affectée en présence de sérotonine provoquant ainsi une augmentation de la virulence de cette bactérie envers des modèles murins (**Knecht et al.**, 2016). De plus, Dagorn et al., ont travaillé sur l'effet du GABA envers *Pseudomonas fluorescens* (**Dagorn**

et al., 2013), ils ont montré que cette molécule augmentait la cytotoxicité de la bactérie, suite à une modification du LPS. Chez *P. aeruginosa*, un traitement par le GABA augmente la virulence bactérienne par cyanogénèse. En effet, les gènes impliqués dans la production du HCN sont régulés par le QS, qui est lui-même impacté par le GABA (**Dagorn et al.**, 2013).

Enfin, la substance P (SP), qui est un neuropeptide sécrété au niveau de l'intestin et de la peau, est capable de stimuler la cytotoxicité d'*E. faecalis* V583 (**Biaggini et al.**, 2017), mais aussi la virulence de *S. aureus* et *S. epidermidis* sur des épidermes humains reconstitués (RHE) ainsi que leur potentiel d'adhésion sur des kératinocytes (**N'Diaye et al.**, 2016). Chez *Bacillus subtilis*, il a été montré que la SP est capable de se fixer sur EF-Tu (*Elongation Factor Thermo unstable*) (**Mijouin et al.**, 2013). Ce facteur d'élongation procaryote, généralement impliqué dans la traduction, semble agir comme une « moonlight proteine » ayant plusieurs fonctions et pourrait donc être le récepteur putatif à la SP.

III. Catécholamines

A. Catécholamines chez les eucaryotes

1. Voie de synthèse et fonctions

Les catécholamines sont des molécules impliquées dans la réponse au stress. Au sein du corps humain, il en existe trois, la dopamine, la norépinéphrine, aussi appelée noradrénaline et l'épinéphrine connue également sous le nom d'adrénaline. Chacune de ces molécules possède un noyau catéchol, qui se compose d'un noyau benzène avec deux groupements hydroxyle. La norépinéphrine présente un groupement NH_2 et l'épinéphrine un groupement CH_3 [Figure 20].

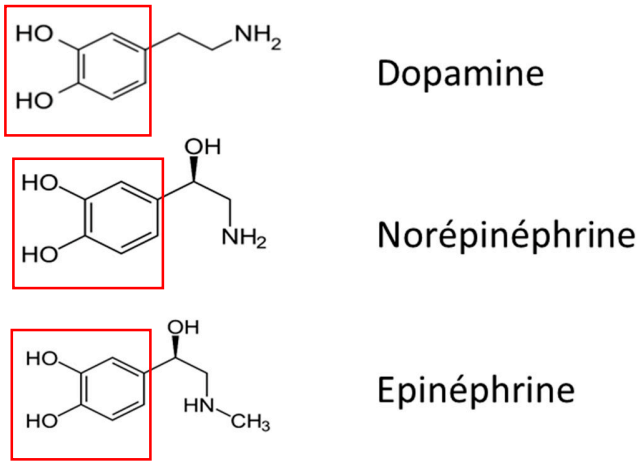


Figure 20. Structures chimiques des catécholamines (noyau catéchol encadré en rouge)

Les catécholamines sont des molécules synthétisées à partir d'un acide aminé : la tyrosine que l'on peut trouver dans certains aliments. La tyrosine, présente dans le sang va être transportée à l'intérieur des neurones par l'intermédiaire de systèmes de transport des acides aminés neutres. La première étape de la biosynthèse des catécholamines est l'hydroxylation de

la tyrosine en dihydro-phénylalanine (DOPA) grâce à la tyrosine hydroxylase. La DOPA est décarboxylée par une enzyme spécifique des acides aminés aromatiques en dopamine. Elle est par la suite hydroxylée pour donner la norépinéphrine, qui à son tour sera méthylée pour donner l'épinéphrine grâce à une enzyme spécifiquement présente au sein de la médullosurrénale, la phényléthanolamine N-méthyltransférase (**Axelrod**, 1962) [Figure 21].

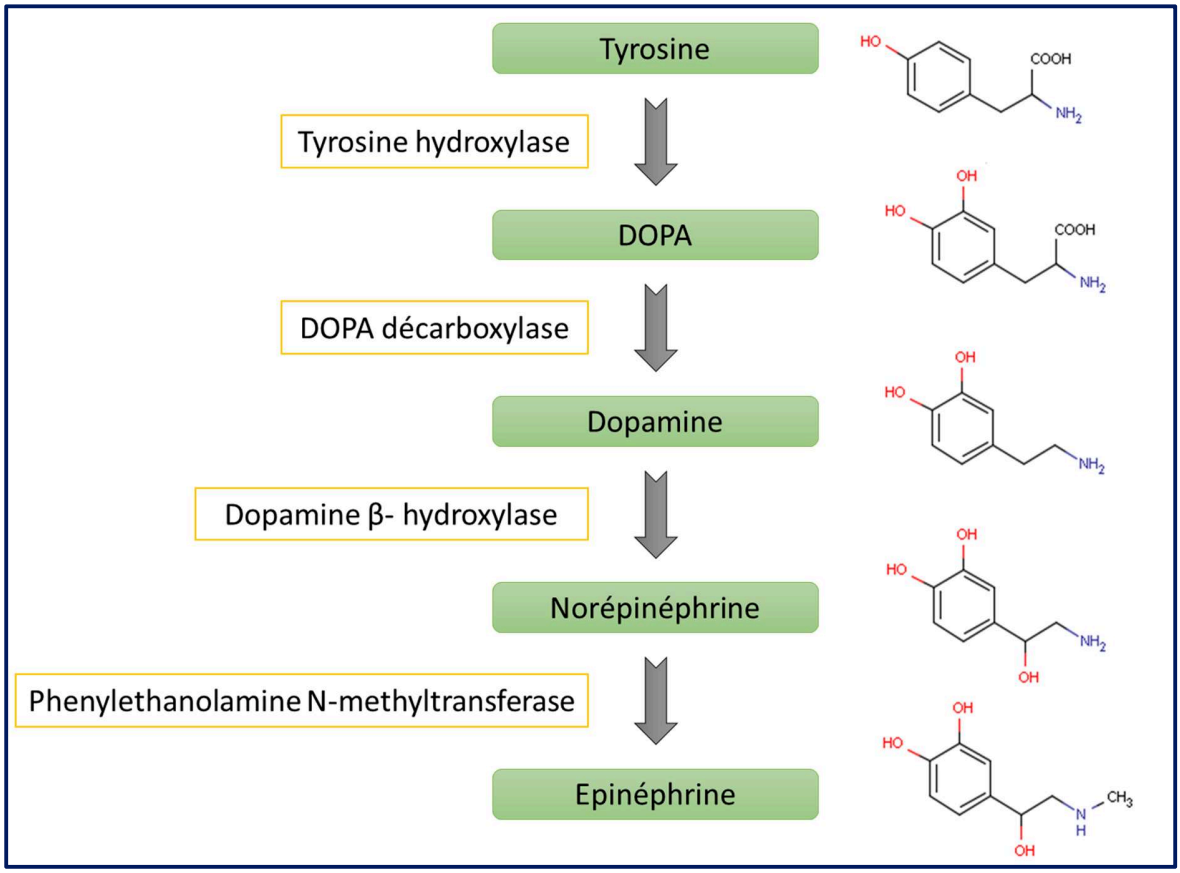


Figure 21. Biosynthèse des catécholamines (en vert : molécules, encadré jaune : enzymes)

III. Catécholamines

Norépinéphrine et épinéphrine sont des molécules endogènes qui peuvent avoir un rôle de neurotransmetteurs ou d'hormones. Lorsqu'elles sont sécrétées au niveau des synapses de neurones appartenant au système nerveux sympathique, elles vont jouer le rôle de neurotransmetteurs (principalement la norépinéphrine) au niveau des organes effecteurs, l'acétylcholine transmettant auparavant l'information de la moelle épinière vers le neurone.

Norépinéphrine et épinéphrine sont considérées comme des hormones lorsqu'elles sont relarguées dans la circulation sanguine, après avoir été produites au niveau de la médullosurrénale (épinéphrine 80% - norépinéphrine 20%) et vont aussi agir au niveau des organes effecteurs [Figure 22].

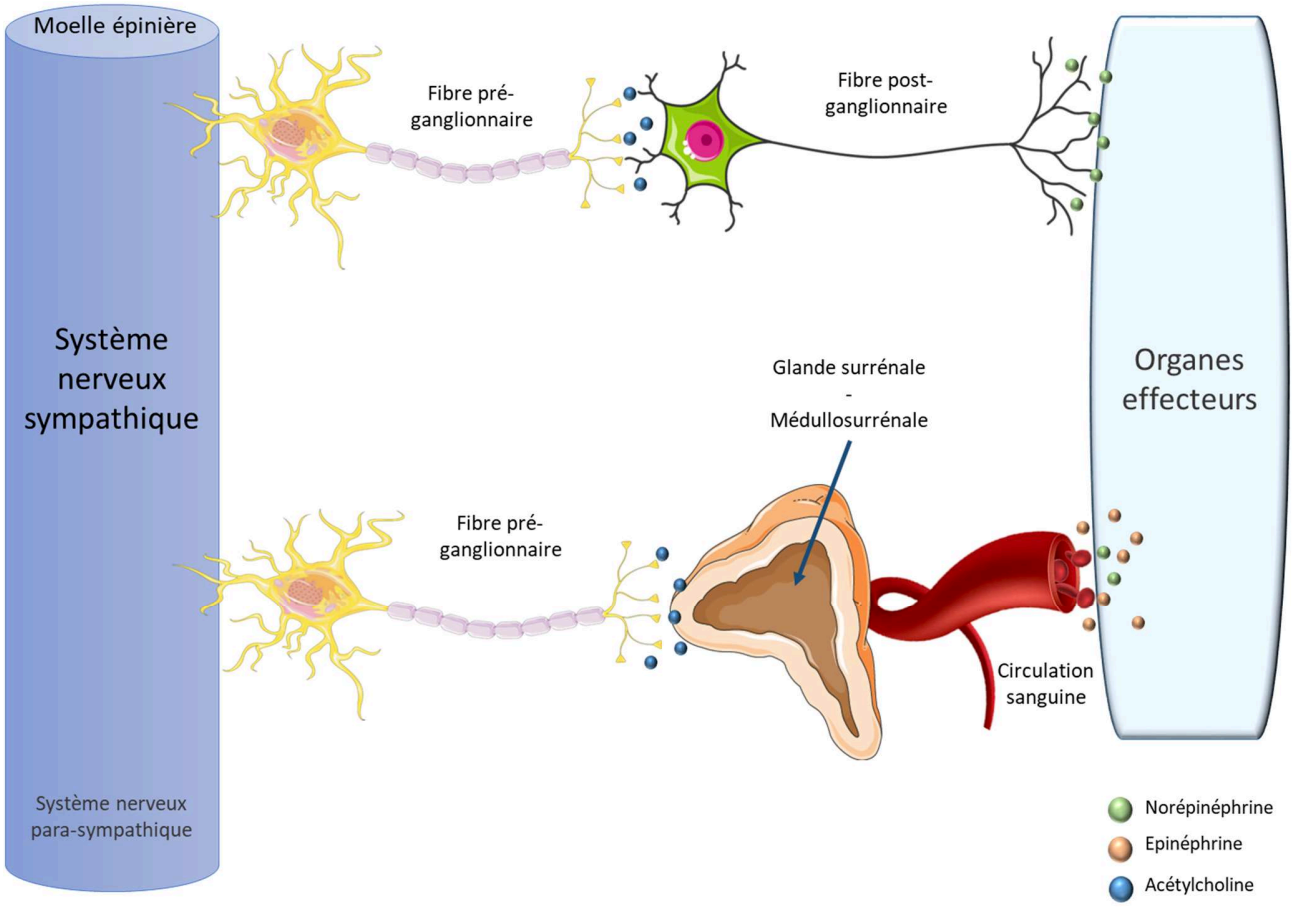


Figure 22. Lieu de production et de sécrétion des catécholamines

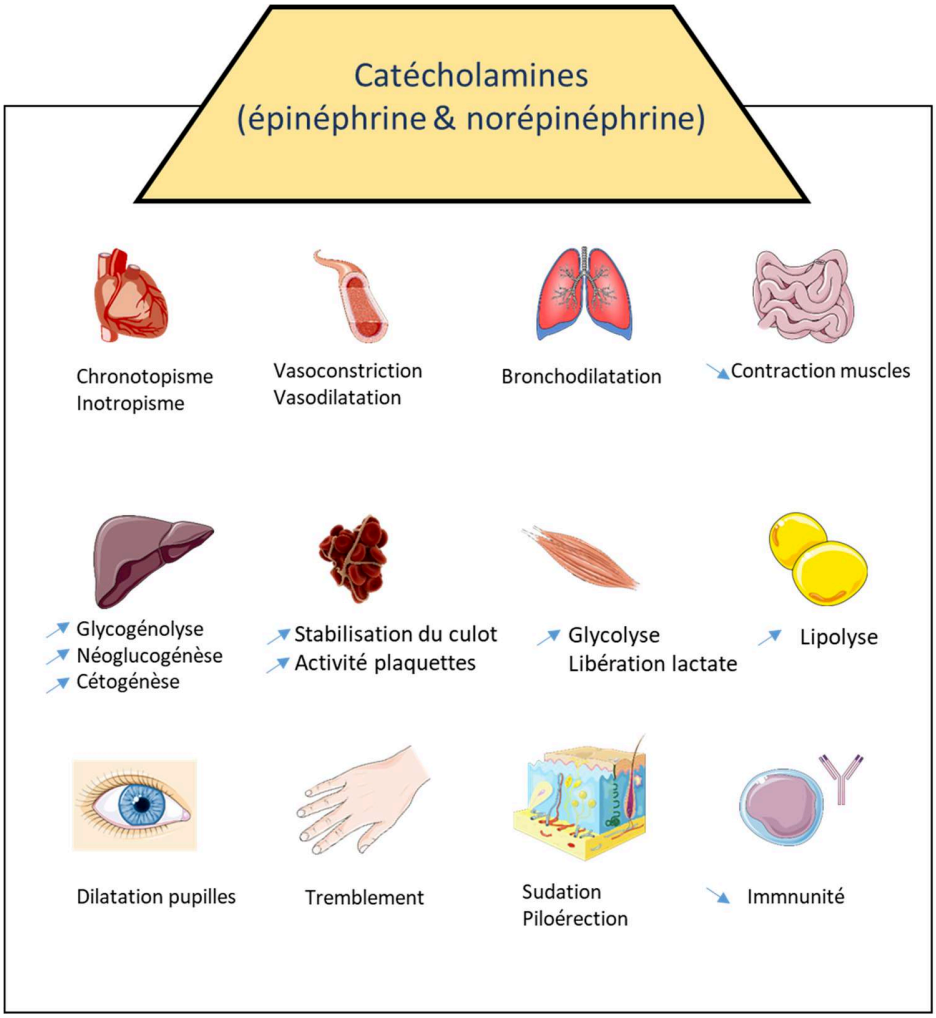


Figure 23. Effets de l'épinéphrine et de la norépinéphrine sur la physiologie humaine (adaptée de (**Andreis & Singer**, 2016))

Les catécholamines ont la capacité de réguler l'activité d'un nombre important de cellules au sein des organes [Figure 23]. L'un des rôles majeurs du système nerveux sympathique et de la médullosurrénale est la réponse au stress, phénomène aussi connu sous le nom de « *fight, or flight response*», et nommé ainsi en 1915 par Cannon (**Cannon**, 1915). Sous l'effet d'un stress, l'Homme va avoir tendance à choisir entre « lutter » ou « fuir ». Un nombre important de réactions et de modifications se mettent alors en place au sein du corps humain pour pouvoir réagir au stress. En effet, les catécholamines provoquent l'augmentation du rythme cardiaque

(action chronotrope positive) et stimulent aussi la force de contraction du cœur (action inotrope positive). Au niveau des vaisseaux sanguins, une balance s'établit entre vasodilatation et vasoconstriction, en fonction des tissus et des récepteurs présents. De plus, la capacité respiratoire est augmentée grâce à une broncho-dilatation pour faire face aux besoins en oxygène. La sécrétion des molécules de stress va aussi engendrer une lipolyse ainsi qu'une glycolyse, afin de subvenir aux besoins en énergie de différents organes, tels que le cerveau, le cœur ou le foie. Les catécholamines permettent un relâchement des muscles lisses au niveau du tractus gastro-intestinal et du système urinaire et elles interviennent aussi au niveau du système immunitaire en modulant la prolifération, la différentiation et l'apoptose de certaines cellules du système immunitaire, de même que la production de cytokines (**Andreis & Singer**, 2016).

2. Récepteurs, transporteurs et antagonistes

Récepteurs

Il existe deux grands groupes de récepteurs adrénergiques chez l'Homme et les animaux, les récepteurs de type α, α1 (α1A, α1B et α1D) et α2 (α2A/D en fonction des espèces, α2B, α2C) et ceux de type β (**Hieble**, 2009). Les récepteurs adrénergiques sont des protéines liées à la membrane qui vont s'activer en présence de norépinéphrine, d'épinéphrine, ou de molécules agonistes. Ils sont constitués d'une chaîne polypeptidique comprenant 400 à 500 résidus d'acides aminés et possédant sept domaines transmembranaires (**Strosberg**, 1993). Les récepteurs adrénergiques appartiennent à une grande famille de récepteurs : les RCPG (récepteurs couplés à une protéine G) [Figure 24], (**Hieble**, 2009). Après reconnaissance du ligand, la transduction du signal se fait chez ces récepteurs grâce à la présence d'une protéine G constituée de trois sous-unités : α, β et γ. La fixation des ligands (norépinéphrine ou épinéphrine) entraine un changement de conformation des récepteurs adrénergiques, qui leur permet d'activer la protéine G.

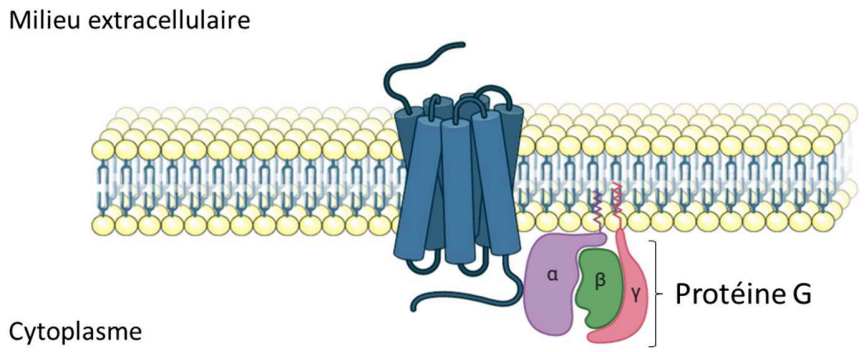


Figure 24. Récepteur adrénergique de type RCPG

La sous-unité α de la protéine G détermine la voie de signalisation qui va moduler l'activité de messagers secondaires (**Marinissen & Gutkind**, 2001). Le récepteur α1 est couplé à une protéine G*q* qui permet l'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+}, par l'intermédiaire de la voie inositol triphosphate (IP3)/diacylglycérol (DAG). Cette voie est activée grâce à la phospholipase C qui va cliver le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) en IP3 et DAG. Les récepteurs de type α2 et β sont respectivement couplés à G*i* et G*s*. Dans les deux cas, le taux d'AMPc est augmenté ou non, en fonction de la stimulation (G*s*) ou de l'inhibition (G*i*) de l'adénylate cyclase (AD), menant à l'activation ou non des protéines kinases A (PKA) et C (PKC) [Figure 25] (**Andreis & Singer**, 2016). Ces changements de concentration intracellulaire en messagers secondaires vont amener aux multiples modifications physiologiques décrites précédemment.

III. Catécholamines

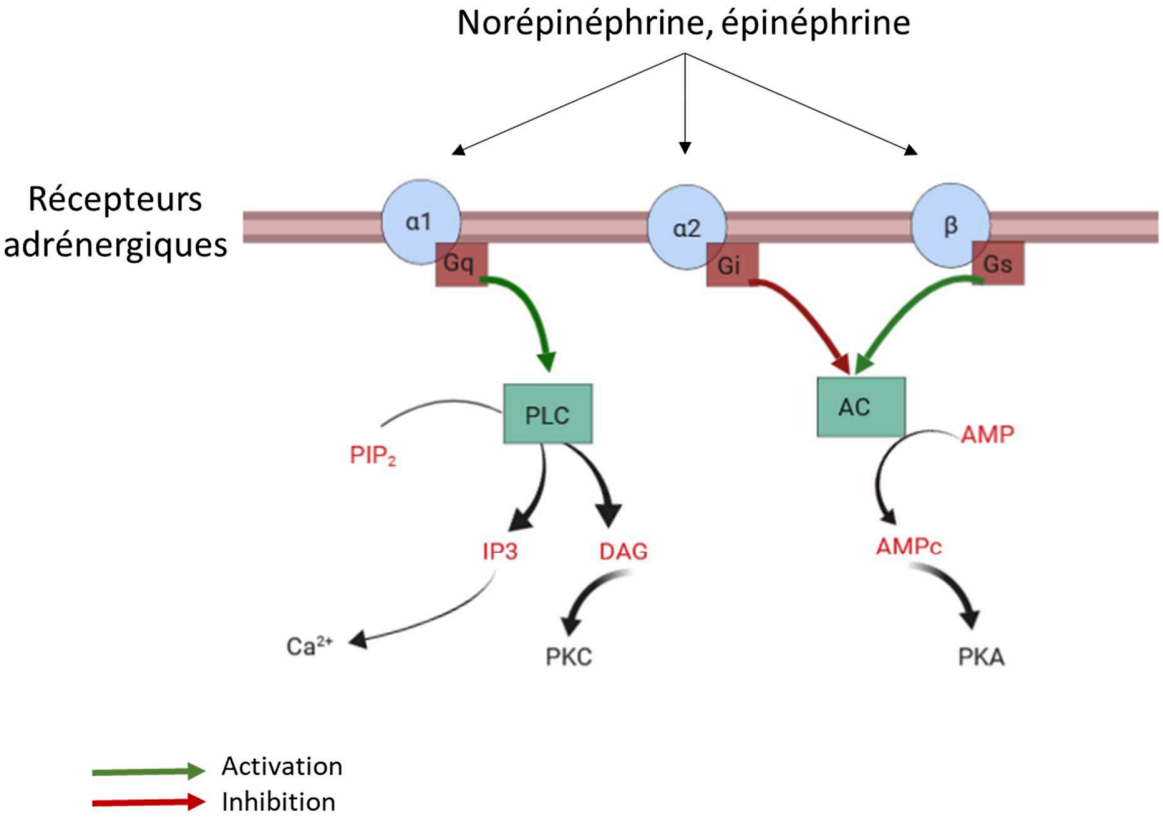


Figure 25. Mécanismes d'action de l'épinéphrine et de la norépinéphrine (adaptée de (**Andreis & Singer**, 2016))

Transporteurs

Les catécholamines peuvent être recapturées afin d'être dégradées, soit au niveau neuronal pré-synaptique (uptake-1) soit au niveau des cellules post-synaptiques (uptake-2) [Figure 26]. Le transporteur NET (*Norepinephrine Transporter*) intervient dans l'uptake-1, et les molécules ainsi recaptées vont être catabolisées par la monoamine oxydase (MAO) située sur la membrane des mitochondries ou de nouveau sécrétées dans l'espace inter-synaptique.

Les catécholamines, capturées par des transporteurs OCT *(organic cation transporter*) et PMAT (*plasma membrane monoamine transporter*) (**Duan & Wang**, 2010) impliqués dans l'uptake-2, vont être également dégradées par la MAO et/ou la catéchol-O-methyl transférase (COMT) située dans le cytosol.

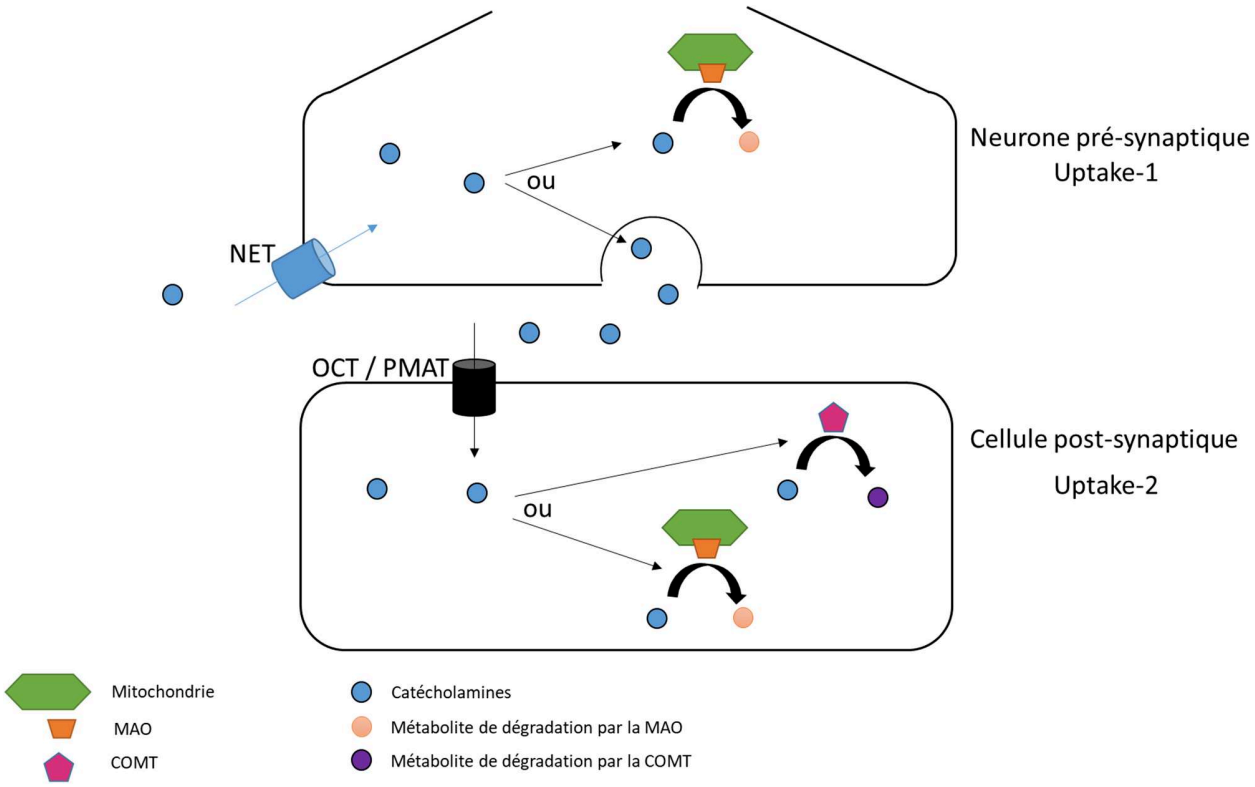


Figure 26. Recapture des catécholamines par des transporteurs (NET : Norepinephrine transporter ; OCT : Organic Cation Transporter ; PMAT : Plasma Membrane Monoamine Transporter ; MAO : MonoAmine Oxydase ; COMT : Catechol-O-Methyl Transferase), (adaptée de (**Marisa et al.**, 2012))

III. Catécholamines

Antagonistes

Il existe des antagonistes adrénergiques qui s'opposent de façon compétitive aux effets des catécholamines. Ces antagonistes sont des molécules qui ont une affinité élevée pour les récepteurs adrénergiques sur lesquels ils se fixent. Ils empêchent ainsi les catécholamines d'exercer leurs effets. Certains antagonistes inhibent spécifiquement les récepteurs α1 comme la phentolamine, ou les récepteurs β comme le propranolol. Il existe également d'autres antagonistes spécifiques comme la niguldipine qui se fixe seulement sur le récepteur de type α1a (**Finch et al.**, 2006). Ces antagonistes peuvent être utilisés dans un cadre médical pour des pathologies comme l'hypertension. C'est par exemple le cas du propranolol qui est utilisé en tant que β-bloquant (**Lewis**, 1976) et a un rôle antihypertensif.

B. Effets des catécholamines chez les procaryotes

1. Croissance

Les premières études menées sur l'effet des catécholamines sur la physiologie bactérienne ont essentiellement décrit l'impact de ces hormones sur la croissance. En effet, les travaux de Lyte et Ernst (**Lyte & Ernst**, 1991) ont montré que plusieurs bactéries à Gram négatif pouvaient voir leur croissance stimulée en présence d'épinéphrine et/ou de norépinéphrine. Une stimulation de la croissance au minimum d'un log a été observée aussi chez des bactéries à Gram positif, telles que *E. faecalis*, *E. faecium*, *L. monocytogenes*, ou encore *S. aureus*, en présence de norépinéphrine (**Freestone et al.**, 1999).

D'autres travaux ont également mis en évidence ces effets sur des bactéries anaérobies à Gram négatif (*Eikenella corrodens*, *Campylobacter gracilis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus)* et positif *(Actinomyces naeslundii* et *Actinomyces gerenscseriae*), responsables de parodontites (**Roberts et al.**, 2003). Parmi ces pathogènes anaérobies, *P. gingivalis* et *B. forsythus*, ont vu leur croissance inhibée en présence de norépinéphrine de respectivement 12% et 22%.

Cette réponse à la présence de catecholamines n'est pas systématique puisque certaines bactéries à Gram négatif notamment, ne présentent pas de variations de croissance en présence de ces hormones. De même qu'au sein d'un même genre bactérien, la réponse à la présence d'épinéphrine ou norépinéphrine peut varier en fonction des espèces. C'est le cas des bactéries appartenant au genre *Vibrio*, pour lesquelles certaines espèces présentent une stimulation de leur croissance plus ou moins importante en présence d'épinéphrine et/ou norépinéphrine comme pour *V. parahaemolyticus* et *V. mimicus* (**Nakano et al.**, 2007), *V. harveyi* (**Yang et al.**, 2014) ou encore *V. anguillarum* (**Pande et al.**, 2014).

2. Mobilité

Les différentes stimulations observées pour la mobilité de type swimming sont répertoriées dans le [Tableau 2]. Un antagoniste adrénergique a également été utilisé dans la plupart des études.

Tableau 2. Effets des catécholamines et antagonistes sur le swimming (E : Epinéphrine, NE : Norépinéphrine)

Bactéries	Molécules	Swimming	Inhibiteurs actifs	Références
E. coli O157:H7	E/NE		X : pas utilisé	(**Bansal et al.**, 2007)
P. aeruginosa PA14	NE		X : pas utilisé	(**Hegde et al.**, 2009)
S. Typhimurium	NE		Phentolamine	(**Bearson & Bearson**, 2007; **Peterson et al.**, 2011)
V. campbellii	NE		Phentolamine	(**Pande et al.**, 2014)
V. anguillarum	NE		Phentolamine	(**Pande et al.**, 2014)
V. harveyi	NE		Phentolamine LED209	(**Yang et al.**, 2014)
B. pseudomallei	E		Phentolamine	(**Intarak et al.**, 2014)
Y. ruckeri	NE			(**Torabi Delshad et al.**, 2019)

III. Catécholamines

Les catécholamines, épinéphrine et norépinéphrine, sont capables de stimuler le swimming de bactéries telles que *P. aeruginosa*, *E. coli*, ou encore différentes espèces de *Vibrio*. L'ajout de phentolamine a permis de bloquer les effets induits par les catécholamines. Dans l'étude menée sur *B. pseudomallei*, la phentolamine n'a pas réussi à stopper complètement l'effet de l'épinéphrine. Chez *V. campbellii*, *V. anguillarum* et *Y. ruckeri*, ainsi que chez *V. harveyi* le propranolol n'a pas permis non plus de bloquer les effets stimulants induits par la norépinéphrine.

Chez *V. harveyi*, les gènes impliqués dans la formation du flagelle sont surexprimés en présence de catécholamines (**Yang et al.**, 2014), ce qui est aussi le cas chez *C. jejuni* (**Xu et al.**, 2015). Chez *P. aeruginosa* PA14, une concentration de 50 µM induit une diminution de l'expression des gènes de mobilité (*fimV, pilB, pilD, pilC*) tandis qu'à 500 µM ces mêmes gènes sont surexprimés (**Hegde et al.**, 2009).

3. Adhésion et formation de biofilm

Adhésion

Des études d'adhésion ont été réalisées sur des cellules intestinales (HCT-8, Caco-2), hépatique (Hep-2) mais aussi pulmonaires (SJPL, A549) et sont présentées dans le [Tableau 3].

Tableau 3. Effets des catécholamines sur l'adhésion de bactéries sur cellules eucaryotes

Bactéries	Molécules	Cellules eucaryotes	Effets	Références
P. aeruginosa	NE (500 µM)	HCT-8	↗ x3	(**Hegde et al.**, 2009)
C. jejuni	E/NE (100 µM)	Caco-2	↗ x2 à 5	(**Xu et al.**, 2015)
A. hydrophyla	NE (100 µM)	Hep-2	↗ x0,4	(**Dong et al.**, 2016)
A. pleuropneumoniae	NE (50 µM)	SJPL	↗ x1,5	(**Li et al.**, 2012)
S. pneumoniae	NE (50 µM)	A549	↘ x2	(**Gonzales et al.**, 2013)
E. coli O157:H7	E/NE (50 µM)	HeLa	↗ x3,4 et x5,2	(**Bansal et al.**, 2007)

Ces différentes études ont montré que la norépinéphrine à des concentrations de 50 ou 100 µM permet de stimuler l'adhésion de bactéries sur des lignées cellulaires intestinales, hépatiques, ou bien pulmonaires. Dans le cas de *S. pneumoniae*, la norépinéphrine a, au contraire, diminué par deux la capacité d'adhésion de la bactérie sur des cellules pulmonaires A549.

En 1997, Lyte et al., ont montré que la norépinéphrine augmente l'expression de gènes codant pour l'adhésine K99 chez *E. coli* entérotoxigénique (ECET) (**Lyte et al.**, 1997). Ces adhésines permettent à *E. coli* d'adhérer aux cellules intestinales de l'hôte initiant alors le processus d'infection (**Chan et al.**, 1982). Vlisidou et al., ont aussi montré que la norépinéphrine, pouvait stimuler l'adhésion d'*E. coli* O157:H7 sur des modèles de muqueuses intestinales bovines (**Vlisidou et al.**, 2004).

La capacité de la bactérie *Acinetobacter baumanii* à adhérer à différents types de surfaces (silicone, polyuréthane et polychlorure de vinyle), était stimulée de presque deux log en présence de norépinéphrine à 50 µM (**Inaba et al.**, 2016).

III. Catécholamines

Biofilm

La capacité à former des biofilms en présence de catécholamines a été étudiée chez différentes bactéries dont les résultats sont présentés dans le [Tableau 4].

Tableau 4. Effets des catécholamines sur la formation de biofilm

Bactéries	Molécules	Support	Effets	Références
P. aeruginosa PA14	E/NE (5 µM)	Sonde endotracheale		(**Freestone et al.**, 2012)
V. harveyi	NE (50 µM)	Polystyrène	↗	(**Yang et al.**, 2014)
A. hydrophila	E/NE (100 µM)			(**Dong et al.**, 2016)
Y. ruckeri	NE (100 µM)			(**Torabi Delshad et al.**, 2019)
S epidermidis	NE (10 µM)			(**Lyte et al.**, 2003)
E. coli O157:H7	E/NE (50 µM)			(**Bansal et al.**, 2007)
S. lugdunensis 2554	E (3 µM)			(**Frank & Patel**, 2008)
S. lugdunensis 2414	E (3 µM)		↘	
S. aureus 113	E (3 µM)			

Dans la plupart de ces travaux, le biofilm a été étudié sur une surface polystyrène, et la formation de biofilm était stimulée par la norépinéphrine et l'épinéphrine à des concentrations allant de 5 à 100 µM. Cependant, deux souches de Staphylocoques, *S. lugdunensis* 2414 et *S. aureus* 113 ont, quant à elles, vu leur biofilm diminuer en présence d'épinéphrine à 3 µM.

Chez *V. harveyi*, la production d'EPS était augmentée en présence de norépinéphrine (**Yang et al.**, 2014). La stimulation de la formation de biofilm pourrait, en partie, s'expliquer par un changement dans la production des EPS constituant le biofilm.

L'effet des catécholamines a aussi été étudié sur la dispersion du biofilm, entre autres, chez *Mannheimia haemolytica* (**Pillai et al.**, 2018) où épinéphrine et norépinéphrine sont capables de favoriser la dispersion du biofilm et chez *Cutibacterium acnes* (anciennement *Propionibacterium acnes)* où l'interaction de la norépinéphrine avec la transferrine permet d'augmenter la disponibilité en fer libre, ce qui induit la dispersion du biofilm (**Lanter & Davies**, 2015). Chez *P. aeruginosa*, la norépinéphrine stimule aussi la dispersion du biofilm formé au niveau des plaques d'athéromes. (**Lanter et al.**, 2014), et provoque une libération d'enzymes de dégradation pouvant être nocives pour les tissus de l'hôte.

4. Cytotoxicité et virulence

Sur un modèle de cellules pulmonaires SJPL, l'épinéphrine ou la norépinéphrine augmente et diminue respectivement de 27% et 11% la cytotoxicité de la bactérie *Actinobacillus pleuropneumoniae* (**Li et al.**, 2012). Les catécholamines peuvent parfois ne pas avoir d'effets sur la cytotoxicité bactérienne, c'est par exemple le cas chez *C. jejuni* envers les cellules intestinales Caco-2 (**Cogan et al.**, 2007) ou également chez *P. fluorescens* sur les cellules Caco-2/TC7 non différenciées, avec environ 70% de mortalité cellulaire pour une incubation des cellules eucaryotes avec la bactérie seule et seulement 75% avec la bactérie traitée à l'épinéphrine (**Biaggini et al.**, 2015). Au contraire, des études de translocation et d'invasion cellulaire ont été réalisées avec le pathogène *P. aeruginosa* PAO1 sur les cellules Caco-2/TC7, celles-ci ont montré qu'un prétraitement à 1 µM d'épinéphrine augmentait la translocation bactérienne et le potentiel invasif de cette bactérie (**Kelly Biaggini**, Thèse 2015). Les bactéries *P. aeruginosa* et *C. jejuni* entrainent une diminution de la résistance transépithéliale des cellules Caco-2/TC7 différenciées, plus importante en présence de norépinéphrine ou d'épinéphrine (**Kelly Biaggini**, Thèse 2015 ; **Cogan et al.**, 2007). De plus, il a été montré que la bactérie *C. jejuni* en présence de norépinéphrine pouvait dégrader les jonctions serrées des cellules Caco-2/TC7 (**Cogan et al.**,

2007). Ces perturbations ont aussi été mises en évidence avec d'autres espèces de *Campylobacter* sur des cellules intestinales T84, en présence de norépinéphrine (**Aroori et al.**, 2014).

Des expériences *in vivo*, ont montré que les catécholamines pouvaient diminuer la survie des modèles utilisés. C'est le cas de *V. campbellii*, qui prétraitée avec 100 µM de norépinéphrine, diminue de 15% la survie des larves de crevette géante (**Pande et al.**, 2014). A cette même concentration de norépinéphrine, la bactérie *Y. ruckeri* induit une diminution de la survie des truites arc-en-ciel de 22% (**Torabi Delshad et al.**, 2019). Une réduction de 23% de la survie de larves d'artémies a aussi été montré lorsque *V. harveyi* est prétraitée avec 50 µM de norépinéphrine (**Yang et al.**, 2014).

Le potentiel invasif des bactéries traitées aux catécholamines a également été évalué *in vivo*, sur des modèles de souris. Dong et al., ont mis en évidence que la norépinéphrine augmentait la capacité de prolifération d'*A. hydrophila* dans les poumons (**Dong et al.**, 2016). Initialement administrée au niveau intestinal, la bactérie a transloqué à travers l'intestin et a pu être disséminée jusque dans les poumons de souris.

5. Catécholamines et antibiotiques

Les molécules de stress peuvent permettre une meilleure reprise de croissance après un traitement antibiotique, c'est notamment le cas chez *P. aeruginosa* PA14 (**Freestone et al.**, 2012). En effet, l'étude a été réalisée après 24h en milieu minimum SAPI, supplémenté en concentrations sub-inhibitrices de tobramycine et en présence ou non de norépinéphrine. Les auteurs ont montré que la présence de cette molécule de stress permettait à *P. aeruginosa* d'avoir une meilleure croissance après un traitement antibiotique (10^3 UFC/mL à 24h contre 5.10^5 UFC/mL avec la norépinéphrine). Cet effet a aussi été observé chez *S. epidermidis* avec la rifampicine (**Freestone et al.**, 2008) et chez *A. baumanii* avec la tigécycline (**Inaba et al.**, 2016). Chez *C. jejuni*,

une analyse transcriptomique, a montré que deux gènes (*Cj1583c* et *Cj0193c*) impliqués dans la résistance à la fowlicidine (**Hoang et al.**, 2012), un peptide antimicrobien, étaient surexprimés en présence d'épinéphrine ou de norépinéphrine à 100 µM (**Xu et al.**, 2015).

Au contraire, ces molécules de stress peuvent rendre *S. enterica* serovar Typhimurium plus sensible à un traitement à la polymyxine B (**Karavolos et al.**, 2008), via une diminution de l'expression de l'opéron *pmr* (responsable de la résistance aux polymyxines).

6. Catécholamines et fer

Le fer est un élément essentiel pour la survie des bactéries et notamment chez de nombreux pathogènes (**Ratledge & Dover**, 2000), et la présence de protéines de type transferrine et lactoferrine, capables de séquestrer le fer, constitue une stratégie clef de notre système immunitaire afin de limiter le fer disponible pour les bactéries et ainsi réduire leur capacité de prolifération. Les premières évidences des effets des catecholamines sur la croissance de certaines bactéries à Gram négatif ont été obtenues en utilisant un milieu « serum-like » contenant des transferrines (Tf) et lactoferrines (Lf). Ce milieu mime un environnement stressant et bactériostatique pour la bactérie, et se rapprocherait donc plus des conditions que les bactéries pourraient rencontrer au sein de l'hôte (**Burton et al.**, 2002; **Freestone et al.**, 2003; **Lyte**, 2004). En effet, une étude a montré que l'épinéphrine, la norépinéphrine ainsi que la dopamine formaient un complexe avec le fer ferrique Fe^{3+} présent dans ces protéines (**Sandrini et al.**, 2010). Le noyau catéchol des catécholamines va alors fixer le fer séquestré par les Tf et Lf du sérum, réduisant ainsi leur affinité avec ces dernières. La présence de catécholamines stimulerait la croissance bactérienne, en rendant disponible pour les bactéries, le fer contenu dans les Tf et Lf. Cependant, le mécanisme exact par lequel le fer serait incorporé dans la bactérie, en présence de catécholamines, reste encore à ce jour non élucidé. Les catécholamines pourraient rendre le fer biodisponible pour la bactérie, en réduisant uniquement son affinité pour les Tf et Lf et/ou former un complexe directement assimilable par la bactérie. Lorsque les bactéries se retrouvent en milieu carencé en fer, l'assimilation de celui-ci est rendue possible par la production de molécules,

capables de capter le fer dans le milieu, appelées sidérophores. L'assimilation du complexe sidérophore/fer se fait ensuite par des récepteurs spécifiques Ton-B dépendants (**Ratledge & Dover**, 2000). Chez *P. aeruginosa*, il existe au moins 34 récepteurs Ton-B dépendants ou putatifs, et notamment ceux impliqués dans la recapture de la pyoverdine et de la pyocheline, les deux principaux sidérophores (**Cornelis & Bodilis**, 2009). En présence de norépinéphrine, la souche *P. aeruginosa* PA14 présente une diminution de l'expression des gènes codant pour la synthèse de ses sidérophores (**Li et al.**, 2009). Plus récemment, la mutation du gène codant pour la protéine TonB2 chez *Actinobacillus pleuropneumoniae* empêche la stimulation de la croissance par les catécholamines (**Li et al.**, 2015). Ceci est conforté par une autre étude réalisée par Dong et al., chez *Aeromonas hydrophila* (**Dong et al.**, 2016). Ces résultats suggèrent que l'effet des catécholamines chez ces bactéries pourrait être, en partie, étroitement lié au fer.

C. Senseurs et transporteurs procaryotes pour les catécholamines

Le système QseBC

Le TCS, pouvant reconnaître les hormones norépinéphrine et épinéphrine, qui a été le plus étudié, est le système QseBC, présent chez *E. coli* mais aussi chez *S. enterica* Serovar Typhimurium. La capacité de la protéine QseC à fixer l'épinéphrine a été décrite par Sperandio et al. (**Sperandio et al.**, 2003). Chez *E. coli*, le senseur QseC se trouve au niveau de la membrane interne de *E. coli*, et possède deux domaines transmembranaires, entre lesquels, se trouve une partie périplasmique capable de fixer l'épinéphrine, la norépinéphrine, mais aussi l'autoinducteur-3 (AI-3), une molécule impliquée dans la communication bactérienne de type QS [Figure 27] (**Clarke & Sperandio**, 2005).

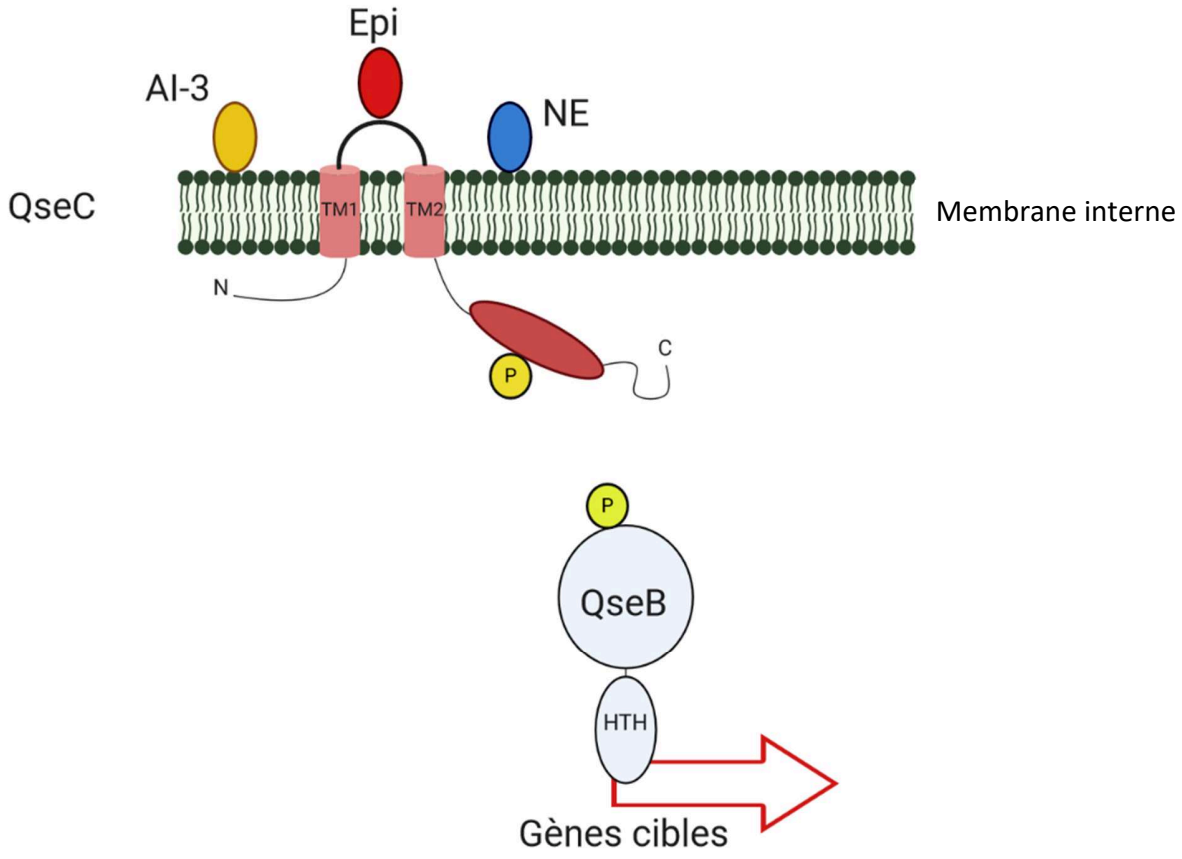


Figure 27. Représentation schématique du système QseBC (adaptée de (**Rasko et al.**, 2008))

Chez *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, il a été montré que le système QseBC, était activé par les catécholamines et le fer (**Weigel et al.**, 2015). Les auteurs de cette étude ont également montré qu'un motif (EYRDD) présent sur la séquence périplasmique de QseC était nécessaire chez cette bactérie pour l'activation du senseur QseC (**Weigel et al.**, 2015). Cependant, ce motif également retrouvé chez *Haemophilus influenzae,* ne permet pas à cette bactérie de répondre aux catécholamines, mais seulement à la présence de fer (**Steele et al.**, 2012).

Les systèmes senseurs alternatifs

Chez certaines bactéries, d'autres systèmes alternatifs sont impliqués dans la reconnaissance des catécholamines [Tableau 5].

Tableau 5. Liste des récepteurs adrénergiques bactériens alternatifs

Nom du système	Molécules	Organismes	Références
QseEF	**E**	*E.coli ECEH*	(**Reading et al.**, 2007)
BasRS	**E/NE**	*Salmonella Typhimurium*	(**Karavolos et al.**, 2008)
CpxAR	**E/NE**	*Salmonella* enterica serovar Typhi	(**Karavolos et al.**, 2011)

Il existe donc, chez les bactéries, différents TCS capables de ressentir les catécholamines. Chez l'Homme, nous avons vu que des antagonistes aux récepteurs adrénergiques pouvaient être utilisés pour bloquer les effets des catécholamines. En transposant ce qui est connu des récepteurs adrénergiques eucaryotes, des travaux ont visé à étudier l'effet d'antagonistes adrénergiques en présence de catécholamines sur la mobilité bactérienne comme vu précédemment dans le [Tableau 2], ou la croissance bactérienne. La phentolamine, par exemple, a permis de bloquer la stimulation de croissance induite par l'épinéphrine ou la norépinéphrine (**Dong et al.**, 2016). Dans d'autres cas, l'ajout d'antagonistes n'inhibait pas l'effet sur la croissance bactérienne (**Freestone et al.**, 2007; **Li et al.**, 2015; **Nakano et al.**, 2007). Ces résultats laissent suggérer que certains antagonistes adrénergiques eucaryotes ne sont peut-être pas adaptés pour bloquer complètement les récepteurs adrénergiques bactériens, ou bien que l'effet observé n'était pas seulement dû à une action via un récepteur.

Transporteurs

Nous avons vu qu'il existait des transporteurs de monoamines (OCT et PMAT) chez les eucaryotes (§ III.A.2). Une étude récente de Lyte et Brown a mis en évidence, pour la première

fois, que ces transporteurs peuvent être présents chez les bactéries, et plus précisément chez une souche probiotique de *Lactobacillus* (**Lyte & Brown**, 2018). L'utilisation de fluorochromes spécifiques mimant le passage d'amines biogènes (norépinéphrine, dopamine) à travers les deux transporteurs (IDT307 pour le passage par PMAT et ASP+ pour celui à travers OCT) a mis en évidence le passage de ces fluorochromes chez *Lactobacillus salivarius*. Cette étude laisse suggérer que l'action des catécholamines pourrait aussi parfois se faire directement dans le cytoplasme de la bactérie, après passage par ces transporteurs, sans impliquer nécessairement la cascade de régulation induite par les TCS

III. Catécholamines

.

Objectifs

Objectifs

Les catécholamines (épinéphrine, norépinéphrine) sont des molécules essentiellement libérées lors d'un trauma ou d'un stress. De nombreux travaux ont montré que ces substances sont capables d'induire des changements physiologiques tels qu'une stimulation de la croissance, de la formation de biofilm ou encore une augmentation de la virulence chez des bactéries pathogènes. Jusqu'à présent, l'effet de ces catécholamines a été étudié principalement chez les bactéries à Gram négatif, mais leur impact sur *P. aeruginosa* a été peu exploré (**Freestone et al.**, 2012; **Hegde et al.**, 2009; **Li et al.**, 2009). Leur action sur des bactéries à Gram positif est également très peu documentée, pour *E. faecalis* notamment, une seule étude montrant une stimulation de croissance en présence de catécholamines est disponible dans la littérature scientifique (**Freestone et al.**, 1999). Pourtant, ces deux bactéries, *P. aeruginosa* et *E. faecalis* présentes au niveau de l'intestin, de la peau ou des poumons, font partie des pathogènes opportunistes fréquemment isolés lors d'infections nosocomiales, et elles peuvent donc se retrouver en contact constant avec une multitude de molécules sécrétées par le corps humain. Dans ce contexte, il nous a semblé intéressant d'étudier l'impact des catécholamines sur ces bactéries.

Les premiers travaux, réalisés par Kelly Biaggini (Thèse 2015), ont montré que *P. aeruginosa* et *E. faecalis* semblent pouvoir moduler leur physiologie en réponse à la présence d'épinéphrine. Au cours de ma thèse, nous avons complété ces résultats et essayé de décrypter les mécanismes mis en jeu. Ainsi, la réponse physiologique de *P. aeruginosa* et *E. faecalis* a été étudiée pour différentes concentrations d'épinéphrine, principalement leur capacité d'adhésion, de formation de biofilm et leur virulence. Ces tests physiologiques ont été complétés par des approches protéomiques et transcriptomiques. La présence d'un senseur putatif à l'épinéphrine a aussi été recherchée chez ces deux bactéries, en se basant sur le récepteur QseC connu chez *E. coli*.

Le chapitre 1, présente les résultats obtenus concernant l'effet de l'épinéphrine sur *P. aeruginosa* en milieu riche (Luria-Bertani, LB), rédigés sous la forme d'un article scientifique actuellement en révision pour publication dans *Scientific Reports*, suivi de résultats complémentaires, notamment une analyse protéomique globale.

Objectifs

La suite des travaux (chapitre 2), a consisté en l'étude de l'effet de l'épinéphrine sur *P. aeruginosa* en milieu sérum-SAPI, afin de mieux simuler les conditions *in vivo*, et essayer de comprendre les mécanismes d'action de cette hormone de stress, en utilisant des approches physiologiques et transcriptomiques.

En parallèle (chapitre 3), l'effet de l'épinéphrine et de la norépinéphrine a été étudié pour la première fois chez des souches d'*E. faecalis* pathogènes mais aussi probiotiques. Les résultats de ces travaux ont fait l'objet de la rédaction d'une publication qui sera soumise prochainement dans le journal *Frontiers in Microbiology*.

Le chapitre 4 regroupe des analyses *in silico* destinées à la recherche de senseurs adrénergiques putatifs chez *P. aeruginosa* et *E. faecalis*.

Le manuscrit de thèse se termine enfin par une conclusion générale de l'ensemble de ces travaux et les perspectives qui en découlent.

Matériels et Méthodes

I. Cultures bactériennes

A. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées lors de cette étude sont référencées dans le [Tableau 6].

Tableau 6. Liste des souches bactériennes

Souches	Caractéristiques	Antibiotiques (µg/mL)	Références
Pseudomonas aeruginosa			
H103			(**Hancock & Carey**, 1979)
H103 GFP	pHC60 (*gfp*, tet^R) (**Cheng & Walker**, 1998)	Tétracycline (100)	Cette étude
PAO1	Sauvage		(**Ghysels et al.**, 2004)
PAO1-*ΔpvdDpchEF*	Mutant allélique de *pvdD* et *pchEF*		(**Ghysels et al.**, 2004)
PAO1-*ΔpvdDpchEFΔfpvA*	Mutant allélique *fpvA* dans le mutant *pvdD, pchEF*	Gentamycine (100)	(**Ghysels et al.**, 2004)
PAO1-*ΔpvdDpchEFΔfpvB*	Mutant allélique *fpvB* dans le mutant *pvdD, pchEF*		(**Ghysels et al.**, 2004)
PAO1-*ΔpvdDpchEFΔfpvAfpvB*	Mutant allélique *fpvB* dans le mutant *pvdD, pchEF, fpvA*	Gentamycine (100)	(**Ghysels et al.**, 2004)
Enterococcus faecalis			
MMH594	Sauvage, clinique (isolée du sang)		(**Huycke et al.**, 1991)
V583	Sauvage, clinique (isolée du sang)		(**Sahm et al.**, 1989)
OB15	Sauvage, alimentaire		(**Baccouri et al.**, 2019)
Symbioflor 1 Clone DSM 16431	Sauvage, pharmaceutique		(**Fritzenwanker et al.**, 2013)
Escherichia coli			
OP50	Sauvage		(**Stiernagle**, 2006)

B. Conservation des souches

Les différentes souches bactériennes utilisées lors de cette étude ont été isolées sur milieu gélosé avant conservation à -80°C en sucrose 35% et glycérol 7,5% (Microbank®, Pro-Lab, Ontario, Canada).

C. Milieux de culture

Plusieurs milieux de cultures ont été utilisés lors de cette étude. Par soucis de clarté, la composition du milieu LB contenant différentes concentrations d'agar, est détaillée dans le [Tableau 7] et les autres milieux de culture sont présentés dans le [Tableau 8]. Au besoin, les milieux peuvent être supplémentés en tétracycline (Tet) ou gentamycine (Gm) aux concentrations citées dans le [Tableau 6]. Sur milieu gélosé, la concentration en Tet peut être ajustée à 250 µg/mL.

Tableau 7. Composition du milieu Luria-Bertani (LB)

	LB					
Composition	***Liquide***	***Gélosé 1,5%***	***Gélosé 1%***	***Gélosé 0,6%***	***Gélosé 0,3%***	***Fournisseur***
Pastone			10 g/L			Biomérieux, Marcy L'Etoile, France
Extrait de levure			5 g/L			BD, Franklin Lakes, New Jersey, Etats-Unis
NaCl			5 g/L			VWR, Radnor, Etats-Unis
Agar Noble	-	15 g/L	10 g/L	6 g/L	3 g/L	BD, Franklin Lakes, Etats-Unis

Tableau 8. Liste des milieux et leur composition

Milieu	Composition	Concentration	Fournisseur
BHI	Cervelles de veau	7,7 g/L	BD, Franklin Lakes, New Jersey, Etats-Unis
	Cœur de bœuf	9,8 g/L	
	Peptone de protéose	10 g/L	
	Dextrose	2 g/L	
	Chlorure de sodium	5 g/L	
	Phosphate disodique	2,5 g/L	
Nematode Growth Medium (NGM)	NaCl	3 g/L	VWR, Radnor, Etats-Unis
	Protéase peptone n°3	2,5 g/L	BD, Franklin Lakes, New Jersey, Etats-Unis
	Agar Technical	17 g/L	Biomérieux, Marcy L'Etoile, France
	A supplémenter avec :		
	KH_2PO_4 pH 6	3,4 g/L	Alfa Aesar, Haverhill, Massachusetts, États-Unis, Etats-Unis
	$MgSO_4$	120 mg/L	Fisher Chemicals, Hampton, New Hampshire, États-Unis
	$CaCl_2$	111 mg/L	Acros Organics, Hampton, New Hampshire, États-Unis
	Cholestérol (éthanol 100%)	5 mg/mL	Acros Organics, Hampton, New Hampshire, États-Unis
M9	Na_2HPO_4	6 g/L	Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis
	KH_2PO_4	3 g/L	Alfa Aesar, Ward Hill, Etats-Unis
	NaCl	5 g/L	VWR, Radnor, Etats-Unis
	A Supplémenter avec : MgSO4	120 mg/L	Fisher Chemicals, Hampton, New Hampshire, États-Unis
C.E.L.K.A	NaCl	4 g/L	VWR, Radnor, Etats-Unis
	Peptone	2,5 g/L	
	Bactotryptone	5 g/L	AES laboratoire, Bruz, France
	Extraits de levure	2,5 g/L	BD, Franklin Lakes, New Jersey, Etats-Unis
SAPI	NH_4NO_3	6,25 mM	Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, États-Unis
	KH_2PO_4	1,84 mM	Alfa Aesar, Ward Hill, Etats-Unis
	KCl	3,35 mM	Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, États-Unis
	$MgSO_4$	1,01 mM	Fisher Chemicals, Hampton, New Hampshire, États-Unis
	Glucose	2,77 mM	Merck, Darmstadt, Allemagne
	Sérum Bovin Adulte	30% (V/V)	Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis
Gélose molle	Agar noble	7 g/L	BD, Franklin Lakes, New Jersey, États-Unis

D. Catécholamines

Selon les expériences, les bactéries ont été exposées aux catécholamines, référencées dans le [Tableau 9].

Tableau 9. Catécholamines utilisées dans cette étude

Molécule	Formule	Origine	Conservation
Epinéphrine	$C_9H_{13}NO_3$	Sigma- Aldrich Saint-Louis, Missouri, États-Unis	4°C
Norépinéphrine	$C_8H_{11}NO_3$	Sigma- Aldrich Saint-Louis, Missouri, États-Unis	-20°C

Les molécules ont été reçues sous forme de poudre et conservées selon les recommandations du fournisseur. Les solutions mères ont été préparées dans de l'eau ultra-pure stérile pour l'épinéphrine et dans du HCl 1M (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis) dans le cas de la norépinephrine, à une concentration de 1 mM.

E. Culture bactérienne

Pour chaque expérience, les bactéries ont été précultivées à partir des cryotubes dans un milieu LB ou du BHI, en fonction de la souche. Les précultures ont été mises à incuber sur la nuit à 37°C en condition statique pour les souches d'*E. faecalis* et en agitation orbitale à 180 rpm pour les souches de *P. aeruginosa* et pour *E. coli*.

II. Biologie Moléculaire

A. Construction de la souche H103-GFP

Des cellules électrocompétentes de *P. aeruginosa* ont été préparées par lavages dans une solution de sucrose 300 mM stérile. A partir de 1 mL de culture en phase stationnaire de croissance, les cellules ont été lavées et concentrées par des centrifugations successives (4000 g, 10 min). Au dernier lavage, les cellules ont été resuspendues avec 100 µL de sucrose 300 mM. Environ 50 ng d'ADN plasmidique (plasmide pHC60 (gfp, tet^R)) ont été ajoutés à 100 µL de solution bactérienne dans une cuve d'électroporation (1 mm de distance inter-électrodes, ThermoScientific). Les cellules ont ensuite été exposées à un choc électrique de 1800 V, avant d'être resuspendues dans 1 mL de LB et incubées à 37°C sous agitation pendant 2h. Un volume de 100 µL de produit de transformation a été étalé sur gélose sélective, le reste est centrifugé (4000g, 10 min) et repris dans 100 µL de milieu et également étalé sur gélose sélective.

B. Extraction d'ADN

En vue du séquençage, l'ADN d'*E. faecalis* OB15 et MMH594 a été extrait à l'aide du kit GeneJET Genomic DNA (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) selon les recommandations du fournisseur. La concentration et la pureté des échantillons d'ADN ont été évaluées par calcul du rapport DO_{260}/DO_{280} et DO_{260}/DO_{230} par spectrophotométrie (Nanodrop 2000c™, ThermoScientific).

C. Séquençage de souches

La qualité et la quantité d'ADN d'*E. faecalis* OB15 et MMH594 ont été examinées sur une électrophorèse sur gel d'agarose 1%, et également à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop et d'un fluoromètre Qubit (dosage Qubit dsDNA). Des banques d'ADN ont été construites à l'aide du kit de NexteraXT d'Illumina, conformément aux instructions du fabricant (Illumina, San Diego, Californie, Etats-Unis). Le séquençage a été effectué sur la plateforme Illumina MiSeq (LMSM Evreux, Université Rouen Normandie) à l'aide du kit « Reagent v3 » (600 cycles, Illumina, Etats-Unis) afin de générer des lectures appariées de 2 x 250 pb. Les données brutes en sortie du séquenceur ont été nettoyées avec Trimmomatic v.0.36 (**Bolger et al.**, 2014). La qualité des données a été vérifiée à l'aide de FastQC v.0.11.6.1 (**Andrew**, 2010). L'assemblage du génome d'*E. faecalis* OB15 et MMH 594 a été effectué *de novo* à l'aide du logiciel Spades v.3.12.0 (**Bankevich et al.**, 2012). Les assemblages obtenus ont été vérifiés pour leur cohérence, notamment le nombre de contigs, N50, GC% et la taille de l'assemblage à l'aide de Quast v.5.0.0 (**Mikheenko et al.**, 2018). La proximité génomique entre les quatre souches d'*E. faecalis* étudiées (OB15, Symbioflor® 1, MMH594 et V583) a été analysée avec PYANI v.0.2.7 (**Pritchard**, 2017).

D. Extraction des ARN

Afin d'extraire les ARN totaux de *P. aeruginosa*, la technique au phénol acide chaud a été utilisée (**Bouffartigues et al.**, 2012). Dans un premier temps, les bactéries ont été resuspendues dans un tampon de lyse (0,02 M d'acétate de sodium pH 5,5 ; SDS 1% et 1 mM EDTA pH 8, Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis). Les ARN ont par la suite été extraits deux fois dans 600 µL de phénol acide chaud (Sigma Aldrich) par une incubation à 60°C puis une centrifugation de 4 min à 22000 g. La phase aqueuse a été récupérée, ajoutée dans 500 µL de chloroforme/alcool isoamylique (Sigma Aldrich) et centrifugée 4 min à 22000 g. Les ARN ont été précipités sur la nuit à -20°C avec deux volumes d'éthanol 100% (Sigma Aldrich) et 100 mM d'acétate de sodium (Sigma

Aldrich). Après précipitation, une centrifugation a été effectuée à 19000 g pendant 30 min et à 4°C. Le culot contenant les ARN a ensuite été rincé avec de l'éthanol 75% froid (-20°C) puis séché sous hotte chimique afin de faire évaporer tout trace de solvant, avant d'être resuspendu dans 45 µL d'eau DEPC (diéthyle pyrocarbonate, Sigma Aldrich).

Un traitement DNase (DNase I (RNase-free), NEB, Ipswich, Massachusetts, États-Unis) à 37°C a permis de supprimer les traces résiduelles d'ADN dans les échantillons d'ARN extraits. L'efficacité du traitement a été vérifiée par PCR. En cas de présence d'ADN, un deuxième traitement a été réalisé. En absence d'amplification d'ADN par PCR, la DNase a été inactivée par chauffage à 75°C, pendant 10 min en présence d'1 µL d'EDTA 0,5 M, pH 8 (pour protéger les ARN totaux). Une vérification de la qualité et de la quantité des ARN extraits a été effectuée. Pour cela, les extraits ont été visualisés sur gel à 2% d'agarose (Sigma Aldrich), la concentration et la pureté des échantillons d'ARN ont été évaluées par calcul du rapport DO_{260}/DO_{280} et DO_{260}/DO_{230} par spectrophotométrie (Nanodrop 2000c™, ThermoScientific).

E. Synthèse des ADN complémentaires

Afin de réaliser la synthèse des ADN complémentaires (ADNc), la concentration des ARN a été ajustée à 50 ng/µL. La rétro-transcription a été effectuée à l'aide du kit High capacity cDNA RT (Applied Biosystems, Life Technologies) selon les recommandations du fournisseur. Une vérification sur gel à 2% d'agarose a été effectuée à la fin du cycle de RTq-PCR [Tableau 10].

Tableau 10. Mix réactionnel et cycle de la RTq-PCR

Composants	RT+ (volume par tube)	RT- (volume par tube)
Tampon RT 10x	5 µL	5 µL
dNTPs 100 mM	2 µL	2 µL
Random primers	5 µL	5 µL
Reverse Transcriptase	2,5 µL	/
ARN	25 µL	25 µL
H_2O	10,5 µL	13 µL

Cycle RTq-PCR	
25 °C	10 min
37°C	2h
85°C	5 min
4°C	∞

F. Réactions de polymérisation en chaîne (PCR)

Les PCR de routine ont été réalisées dans un volume réactionnel final de 25 µl comprenant : du tampon 2X MasterMix PCR (Thermo Scientific, Waltham, MA, Etats-Unis), 0,5 µM de chaque amorce (Eurogentec, Liège, Belgique), environ 10 ng d'ADN matrice ou 1 µl d'ARN. La réaction de PCR a ensuite été réalisée dans un thermocycleur SimpliAmp™ (Apllied Biosystem, Fisher Scientific), avec une première étape de dénaturation de l'ADN de 5 min à 98°C, 30 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation de 10 sec à 98 °C, une étape d'appariement des amorces de 30 sec à la température d'appariement spécifique des amorces et une étape d'élongation à 72°C dont la durée varie selon la longueur du fragment à amplifier et la vitesse de polymérisation de l'enzyme utilisée (1 min par kb), enfin un cycle d'élongation finale de 5 min termine la réaction pour limiter les élongations incomplètes.

Les fragments d'ADN amplifiés ont été visualisés par électrophorèse en gel d'agarose 1% (Invitrogen) dans un tampon TAE 1X (Tris HCl 40 mM, acétate de sodium 20 mM, EDTA 10 mM pH 7,9) (Biosolve). La migration a été effectuée dans un système d'électrophorèse RunOne (Embi Tec, San Diego, CA, Etats-Unis) pendant 25 min à 135 V. La révélation des bandes a été réalisée par fixation de SYBR Safe (Invitrogen) sur l'ADN et observation sous UV. Le marqueur de taille moléculaire (1 kb Plus DNA ladder, Invitrogen) permet de déterminer la taille de fragments de 0,1 à 12 kb.

G. PCR quantitative en temps réel

Les réactions de PCR quantitative ont été effectuées dans un volume réactionnel final de 13 µL comprenant : du SYBR Green PCR Master Mix 2X (Amplitaq gold DNA polymerase, Applied Biosystems), 0,4 µM de chaque amorce [Tableau 11] et 7,5 ng d'ADNc. Les réactions ont été réalisées sur l'appareil 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem) avec 40 cycles d'amplification (dénaturation : 95 °C, 3 sec ; hybridation des amorces : 60 °C, 30 sec ; élongation :

72°C, 30 sec). Les ARN messagers ciblés lors de l'expérience ont été quantifiés de façon relative en comparant leurs CT (Cycle Threshold) et en utilisant les ARN 16S comme contrôle interne.

Les amorces utilisées dans cette étude ont été choisies à l'aide de l'outil Primer3Plus (https://primer3plus.com/). La synthèse des amorces a été réalisée par la société Eurogentec™. Toutes les amorces sont conservées à -20°C.

Tous les oligonucléotides utilisés lors de cette étude sont listés dans le [Tableau 11].

Tableau 11. Amorces utilisées pour l'étude de l'expression des gènes en qRT-PCR

Code	Nom de l'amorce	Séquence
PA2398	qF-fpvA	TGATCCGCAAGAAACCTACC
	qR-fpvA	CCGCTGACGTCCAGTTCGGA
PA4168	qF-fpvB	GGGGTGATCTACGACCTGAA
	qR-fpvB	GCCGCCGAAGTGTTCGCCCT
PA4221	qF-fptA	AGCACCGAGTACCTCAAGGA
	qR-fptA	AGCGCCGATCCTGCCAGGGC
PA0931	qF-pirA	CCGCAACGACTACAAGAACA
	qR-pirA	AGCAGGTTGCCTTCCAGGCC
PA2688	qF-pfeA	ACACCCTCAACTCGATGCTC
	qR-pfeA	ACACGGTCGCCGTGATAGTC
PA4764	qF-fur	CACATGGTCTGCGTCGATAC
	qR-fur	CGAAGCCGCGCTCGCGGACG
PA4358	qF-feoB	AGGAGGGTGCGTTCCATAC
	qR-feoB	CCAGCGAGGCCTGGGCGGAA
PA1000	qF-pqsE	GGCTGGGACTTGGCGTAG
	qR-pqsE	GGCTGGGACTTGGCGTAG
PA1003	qF-pqsR	AACCTGGAAATCGACCTGTG
	qR-pqsR	TGAAATCGTCGAGCAGTACG
PA0996	qF-pqsA	CGGAGTTGCTGGCATTGC
	qR-pqsA	CTGTTGCCCATGCCATAGC
PA2426	qF-pvdS	GGAACAACTGTCTACCCGCA
	qR-pvdS	GTAGCTGAGCTGTGCCTTGA
PA2413	qF-pvdH	CAGCACCATCCTGTCGTTCCA
	qR-pvdH	GCAGGTTCGCCTTGACCC
PA4217	qF-phzS	CCTGCGCGAATACGAAGAAG
	qR-phzS	CGGCCCATTCCTCTTTTTC
PA4209	qF-phzM	GCTGCGCGTAATTTGATACAAG
	qR-phzM	GATCCCGCTCTCGATCAGATC

III. Physiologie bactérienne

A. Mobilités bactériennes

Les mobilités bactériennes ont été réalisées sur milieu gélosé à différentes concentrations d'agar en fonction du type de mobilité testée.

Le swarming a été réalisé sur une gélose à 0,6% d'agar, par dépôt en surface de 5 µL de suspension bactérienne préparée en eau physiologique (NaCl 9g/L) à DO_{580} 0,1. La mobilité de type swarming est caractérisée par la présence de dendrites partant du centre de la gélose, où le dépôt a été effectué. On évalue cette mobilité par mesure de la dendrite la plus longue.

Le swimming a été réalisé sur une gélose à 0,3% par piqure, à l'aide d'un cure-dent à partir d'une suspension en eau physiologique à DO_{580} 0,1. Le swimming forme un biofilm en forme de halo autour du point d'inoculation, une mesure du diamètre maximal a été réalisée.

Le twitching, quant à lui, a été réalisé à l'aide d'une gélose à 1% d'agar par dépôt de 5 µL au fond de la gélose. Cette mobilité de type twitching, s'opère entre la gélose et la surface de la boîte de Pétri, il a donc été nécessaire d'enlever la gélose et de colorer la boîte de Pétri au cristal violet 0,4%. Plusieurs rinçages à l'eau distillée ont été réalisés puis la zone colorée par le cristal violet a été mesurée.

B. Sensibilité aux bactériophages

Afin d'étudier la fonctionnalité des pili de type IV, deux bactériophages ont été utilisés, le PO4 et le Pf4. Ces bactériophages ne peuvent se fixer que si la bactérie possède des pili de type IV. Pour infecter la bactérie, les pili de type IV doivent être fonctionnels. Pour réaliser ce test, des dilutions en cascade, au $1/10^{e}$, de la solution mère de phage ont été effectuées afin d'avoir des concentrations allant de 10^{8} à 10^{5} UFP (Unité Formant Plage de lyse). Chacune de ces dilutions de

phages a été mélangée à une suspension bactérienne de 10^7 UFC/mL et incubée 5 min avant d'ajouter 5 mL d'agar noble à 0,7%. Le tout a été coulé sur une gélose LB à 1,5% d'agar. Les boîtes ont été incubées 24h minimum à 37 °C afin de pouvoir dénombrer les plages de lyse.

C. Extraction des rhamnolipides

L'extraction des rhamnolipides a été effectuée à partir d'un volume de 1 mL de cultures en phase stationnaire de croissance. Les suspensions bactériennes ont été centrifugées 5 min à 10000 g. Le surnageant a alors été acidifié avec une solution de HCl à 1M jusqu'à atteindre un pH de 3. Les rhamnolipides ont, par la suite, été extraits deux fois à l'acétate d'éthyle (1:1, V/V) (Merck, Darmstadt, Allemagne). Le mélange a été vortexé 20 sec puis centrifugé pendant 5 min à 1200 g. La phase organique a été prélevée et séchée sous hotte chimique pendant toute la nuit. Les extraits concentrés ont été analysés par Chromatographie Liquide Haute Pression couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) au laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marine LBCM (Université de Bretagne Sud, Lorient).

D. Dosage de la pyoverdine

La concentration en pyoverdine a été évaluée à partir de surnageants de cultures de *P. aeruginosa* par mesure à 405 nm. La quantité de pyoverdine a ensuite été normalisée par rapport à la DO_{580} de la culture.

E. Dosage de la pyocyanine

La pyocyanine a été extraite du surnageant de culture par 1 volume de chloroforme pur (Acros Organics, Hampton, New Hampshire, États-Unis) et vortexé pendant 15 sec. La phase organique est récupérée et acidifiée par de l'acide chlorhydrique 0,5 N. La quantité de pyocyanine contenue

dans la phase aqueuse a été évaluée par spectrophotométrie à 520 nm et normalisée sur la DO_{580} de la culture.

F. Etude du biofilm

Différentes techniques d'études de formation de biofilms ont été utilisées : une technique en condition statique en microplaque polystyrène avec coloration au cristal violet, en condition statique en microplaque en verre couplée à la microscopie confocale et en condition dynamique couplée à la microscopie confocale également.

1. Biofilm statique sur surface polystyrène

Des suspensions bactériennes des quatre souches d'*E. faecalis* ont été ensemencées dans du milieu BHI avec ou sans épinéphrine ou norépinéphrine (1 µM ou 100 µM). Un volume de 150 µL a été déposé dans les puits d'une plaque 96 puits en polystyrène (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis). La plaque a été incubée 24h à 37°C en condition statique. Après cette incubation, le milieu de culture a été retiré des puits, et trois lavages ont été effectués avec de l'eau ultra-pure. Les biofilms ont été colorés avec du cristal violet (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis) 0,1% pendant 15 min et la plaque a de nouveau été rincée avec de l'eau ultra-pure puis séchée dans une étuve à 37°C pendant 10 min. Le cristal violet a alors été solubilisé par l'ajout d'éthanol 100%, et dosé à 595 nm à l'aide d'un lecteur de plaque multimode Spark (Tecan, Männedorf, Suisse).

2. Biofilm statique sur surface en verre

Des suspensions bactériennes des quatre souches d'*E. faecalis* ont été ensemencées dans du milieu BHI, additionné de glucose à une concentration finale de 1%, et avec ou sans épinéphrine ou norépinéphrine (1 µM). Un volume de 500 µL de ces suspensions a été déposé dans les puits

d'une plaque 24 puits en verre (Sensoplate, Greiner Bio-one, Frickenhaussen, Allemagne). La plaque a été incubée 24h à 37°C en condition statique. À la fin de l'incubation, le milieu a été retiré, et les puits ont été rincés deux fois avec de l'eau physiologique. Les biofilms ont été colorés avec du Syto9 (Invitrogen, Carlsbad, Californie, Etats-Unis) pendant 15 min à l'obscurité. Les puits ont de nouveau été rincés avec de l'eau physiologique puis observés par microscopie confocale à balayage laser (MCBL).

3. Biofilm dynamique en flow-cell sur surface en verre

L'étude du biofilm en condition dynamique permet un apport continu de nutriments, et a été réalisée selon le protocole développé par l'équipe de Tolkien-Nielsen (**Pamp et al.**, 2009).

Mise en place du système

Les biofilms ont été formés dans des chambres de flux appelées Flow-cell (Biocentrum, DTU, Danemark). La flow-cell est constituée de trois canaux (dimension : 1 x 4 x 40 mm) et fermée par une lamelle de verre de 24 x 50 mm (Deckgläser Thickness No. 1, Knittel Glass, Allemagne), le tout est scellé par une fine couche de silicone transparent (Clear Super Silicone Sealant, 3M, Etats-Unis).

La flow-cell est alimentée en continu par du milieu grâce à une pompe péristaltique reliée par des tuyaux en silicone de 1 x 3 mm (Saint Gobain de Performance Plastic). Pour éviter la présence d'air, qui pourrait endommager les biofilms, des pièges à bulles sont mis en amont de la flow-cell. Une fois assemblé [Figure 28] le système est nettoyé avec du TFD9 (Francklab) pendant 15 min et rincé à l'eau distillée, puis stérilisé avec de l'eau de Javel à 0,5% pendant 2h. Le système est ensuite rincé avec de l'eau physiologique stérile toute la nuit afin d'éliminer toute trace de javel.

Adhésion des bactéries et formation de biofilm

Le milieu de culture (LB supplémenté ou non en épinéphrine) a été relié au montage de manière stérile juste avant l'inoculation de la flow-cell. L'inoculum bactérien a été préparé à partir d'une préculture, la DO_{580} est ajustée à 0,5 en eau physiologique, en présence ou non de l'épinéphrine, 300 µL ont été injectés dans chaque canal de la flow-cell, à l'aide d'une seringue. Après piqure, du silicone a été immédiatement ajouté pour boucher les trous formés par les seringues. Une étape d'adhésion de 2h a été réalisée en conditions statiques et à 37°C. Le système a ensuite été déclampé et un flux de milieu à un débit de 2,5 mL/h a été appliqué pendant 15 min afin d'éliminer les bactéries planctoniques ou faiblement adhérées. L'adhésion bactérienne peut être directement observée au MCBL. La formation de biofilm se fait ensuite sous un flux de milieu (2,5 mL/h) pendant 24h à 37°C.

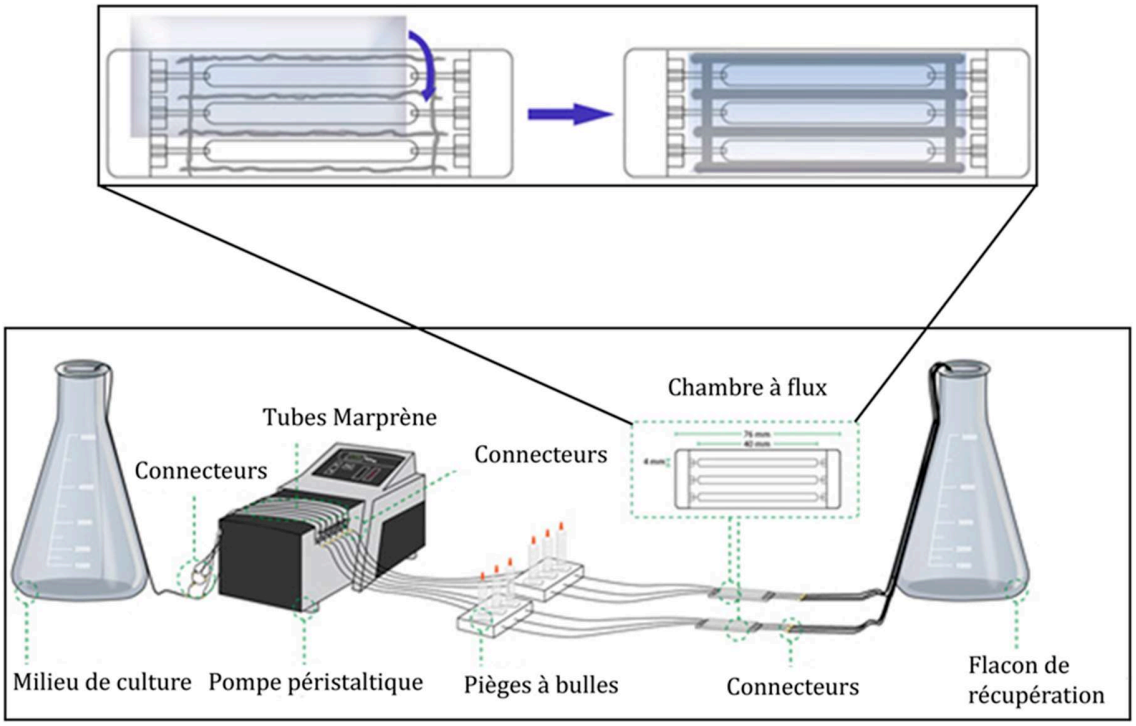


Figure 28. Système de formation de biofilm en chambre à flux (**Weiss Nielsen et al.**, 2011)

Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL)

Les biofilms formés en conditions statiques (décrit III.F.1 et F.2) ainsi que ceux réalisés en flow-cell ont été visualisés au MCBL. La structure du biofilm a été examinée par détection de la fluorescence sous l'objectif à immersion x40. La GFP a été excitée à une longueur d'onde de 488 nm et l'émission a été recueillie entre 500 et 550 nm. Un marqueur intercalant fluorescent le SYTO9 Green (λ excitation = 485-486 nm ; λ émission = 498-501 nm) a été utilisé pour les souches ne portant par le plasmide pHC60 codant pour la GFP.

À l'aide du logiciel Zen (Zeiss, Allemagne), des prises de vues ont été réalisées dans les différentes couches du biofilm permettant ainsi une reconstitution tridimensionnelle ; au minimum trois prises de vues ont été réalisées en des points différents d'un même canal de la flow-cell. Les fichiers de chaque prise de vue ont ensuite été analysés par le logiciel COMSTAT2 (http://www.imageanalysis.dk/) (**Heydorn et al.**, 2000; **Vorregaard**, 2008), trois prises de vue d'au moins deux expériences indépendantes ont été analysées, permettant de déterminer les épaisseurs moyennes et maximales des biofilms ainsi que le biovolume bactérien.

G. Virulence

1. Maintien des cultures de *C. elegans* et test de virulence

Les nématodes telluriques *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), de souches ancestrales Bristol N2, ont été obtenus auprès du CGC (*Caenorhabditis* Genetic Center, Minneapolis MN). Ils ont été cultivés sur des géloses NGM à 22°C. Avant le dépôt des vers sur les géloses NGM, celles-ci ont été ensemencées avec *E. coli* OP50, qui leur sert de source de nourriture.

Une synchronisation de la population des vers est nécessaire pour travailler sur des individus au même stade de développement. Pour cela, les vers présents sur gélose NGM, ont été exposés à une solution d'hypochlorite de sodium (12%) et d'hydroxyde de sodium (2N), jusqu'à ce que les

vers adultes se dissolvent, libérant ainsi les œufs qu'ils contiennent. La réaction a ensuite été stoppée par du milieu M9. Une centrifugation permet de récupérer les œufs afin de les déposer sur une nouvelle gélose, contenant *E. coli* OP50. Les tests de virulence sont effectués lorsque les vers ont atteint un stade de développement L4, qui intervient 48h après la synchronisation de la population.

Un des tests réalisables avec ce modèle est le fast-killing. Il a été effectué sur quelques heures sur milieu gélosé PGS supplémenté en épinéphrine (Peptone-Glucose-Sorbitol agar : 5 g Bactoproteose peptone, 5 g NaCl, 13,7 g D-sorbitol, et 8,5 g Bacto-agar dans 475 mL d'eau, complémenté par 25 mL de glucose à 20%). La veille du test, 50 µL de suspension bactérienne ont été étalés sur une gélose PGS. Les géloses ont été incubées à 37°C sur la nuit et les vers contenus dans le milieu M9 ont été déposés sur les géloses. Ces dernières ont été incubées à 22°C et un dénombrement a été réalisé toutes les 2h à l'aide d'un microscope optique (Zeiss).

2. Test de virulence sur *Galleria mellonella*

La virulence sur le modèle de chenilles a été effectuée avec des cultures de 6h de *P. aeruginosa*. Une centrifugation de la culture a été réalisée et le culot a été lavé une fois en eau physiologique stérile. Après mesure de la DO_{580}, celle-ci a été ajustée pour obtenir une concentration finale 10^5 UFC/mL. Un volume de 10 µL a été injecté par chenilles à l'aide d'un injecteur automatique (KD Scientific KDS 100). Pour la condition épinéphrine, l'inoculum a été préparé avec de l'eau physiologique stérile et de l'épinéphrine. Une vérification de l'inoculum a été réalisée par dénombrement sur milieu gélosé. Pour chaque condition, 15 chenilles ont été utilisées et incubées à 37°C. La survie des chenilles a été évaluée toutes les heures à partir de 16h et jusqu'à 24h après injection.

IV. Culture cellulaire

A. Lignées cellulaires et milieux de cultures

Lors de cette étude, trois types de lignées cellulaires ont été utilisés et sont référencés dans le [Tableau 12].

Tableau 12. Lignées cellulaires

Lignées cellulaires immortelles	Origine
Caco-2/TC7	Cellules épithéliales d'adénocarcinome colorectal humain
HaCaT	Kératinocytes humains

Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM complet constitué du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) de base glucosé (4,5 g/L) (Lonza, Bâle, Suisse), complémenté avec d'autres éléments répertoriés dans le [Tableau 13]. Les cellules Caco-2/TC7 nécessitent un pourcentage de sérum de veau fœtal (SVF) de 15% contrairement aux cellules HaCaT qui nécessitent un milieu avec 10%.

Tableau 13. Composition du milieu DMEM complet

DMEM complet	Concentration	Fournisseur
SVF	10-15%	Lonza, Bâle, Suisse
Pénicilline/Streptomycine	1%	Lonza, Bâle, Suisse
Glutamine	2 mM	Lonza, Bâle, Suisse

B. Culture des cellules

Les cellules eucaryotes sont stockées à -140°C. Une fois décongelées, elles ont été centrifugées à 500 g pendant 5 min, le culot cellulaire a alors été repris dans le milieu DMEM complet. Les cellules ont ensuite été cultivées dans un flask à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO_2. Le milieu de culture a été changé régulièrement. Lorsque les cellules deviennent presque confluentes (90% de cellules formant une monocouche sur la surface du support) un passage est réalisé. Pour ce faire, le tapis cellulaire a été rincé délicatement avec une solution de tampon PBS 1X (Phosphate Buffer Saline, Lonza), puis les cellules ont été décollées par traitement enzymatique avec 2 mL d'une solution de trypsine à 0,05% (Sigma Aldrich), incubées pendant 10 à 15 min à 37°C avec 5% de CO_2. L'action de la trypsine a été stoppée par ajout de DMEM complet. Les cellules ont ensuite été centrifugées 2 min à 500 g, puis le culot a été resuspendu dans du DMEM complet. Pour réaliser les tests d'adhésions, les puits d'une plaque 24 puits ont été ensemencés avec 1 mL de cellules.

C. Adhésions sur cellules

Pour étudier l'adhésion des bactéries sur cellules eucaryotes, celles-ci doivent être confluentes à 100%, afin d'éviter que des bactéries n'adhèrent directement à la surface du puits. Les suspensions bactériennes ont été préparées à partir de cultures centrifugées à 7500 g, 10 min. La DO_{580} a été ajustée à 0,1 en milieu DMEM seul (10^8 bactéries par mL) et les suspensions bactériennes ont été déposées sur les cellules, pendant 2h à 37°C, 5% de CO_2. À la fin de l'incubation, deux rinçages au PBS 1X ont été effectués et les cellules ont été lysées avec du Triton X-100 à 0,1% final, pendant 15 min. Une estimation de l'adhésion bactérienne sur cellules a été réalisée par dénombrement sur milieu gélosé, les résultats ont été exprimés en UFC/mL.

V. Analyse protéomique globale

Afin d'analyser le protéome de *P. aeruginosa*, les extractions de protéines ont été effectuées sur des cultures de 6h. Pour ce faire, à la fin de l'incubation, les cultures ont été centrifugées à 4°C à 7500 g pendant 15 min. Trois lavages du culot ont été réalisés dans une solution de Tris HCl 20 mM à pH 7,4. Le culot a ensuite été repris dans du tampon Tris HCl à 20 mM et traité avec des inhibiteurs de protéase et d'ADN pendant 30 min. Les cellules ont ensuite été lysées par sonication : 1 min de sonication puis 2 min de repos, six fois de suite, puis centrifugées à 10000 g pendant 15 min, à 4 °C. Les protéines ont alors été quantifiées avec un dosage de Bradford (Bio-Rad, Hercules, Californie, États-Unis), suivant les instructions du fournisseur. Les échantillons protéiques ont ensuite été préparés de façon à contenir 30 µg de protéines et ont été envoyés à la plateforme PISSARO (Laboratoire Polymères, Biopolymères, Surfaces, Université de Rouen) pour être analysés par Orbitrap (LTQ, Orbitrap Elite, Thermo Scientific).

IV. Analyses *in silico*

A. Alignement de séquences

La recherche d'homologie de séquences protéiques et les alignements ont été effectués à l'aide du logiciel en ligne BlastP (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins).

B. Analyses de docking moléculaire

Les modélisations des senseurs putatifs de *P. aeruginosa* et *E. faecalis* (PmrB et VicK) ont été réalisées à partir des séquences protéiques et à l'aide du logiciel I-TASSER disponible en ligne (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/). La structure cristallographiée du

transporteur FpvA, ainsi que le ligand naturel ont été obtenus sur le site Protein Data Bank (PDB), sous le numéro d'accession 2W76.

Les protéines et les ligands utilisés (le complexe épinéphrine-fer réalisé sur Molview (http://molview.org/) et l'épinéphrine récupérée à partir de la banque de données PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/) sous le numéro d'accession 5816) ont été préparés sur le logiciel AutoDock Tools 1.5.6 à partir d'AutoDock Vina (**Trott & Olson**, 2010) avant d'être utilisés pour le docking moléculaire. Les simulations d'ancrage ont été effectuées à l'aide de l'algorithme LGA (Lamarckian genetic algorithm). Les paramètres de solvatations ainsi que les charges de Kollman ont été ajoutés (**Morris et al.**, 2009). La position initiale, l'orientation ainsi que les torsions ont été réalisées de manière aléatoire. Le logiciel AutoDock Vina a généré les résultats de docking moléculaire sous la forme d'un fichier .pdbqt avec des valeurs en kcal/mol. Le logiciel Discovery Studio a été utilisé pour obtenir les images d'interactions avec les acides aminés.

Résultats

Chapitre I : Effet de l'épinéphrine sur *Pseudomonas aeruginosa* H103 en milieu LB

I. Introduction

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif connue pour son implication dans de nombreuses infections nosocomiales, notamment chez les patients immunodéprimés et ceux atteint de mucoviscidose (**Ramsey & Wozniak**, 2005). En 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a classé cette bactérie dans la catégorie critique concernant l'antibiorésistance et pour laquelle il est urgent de trouver des solutions. *P. aeruginosa* est connue pour sa pathogénicité importante, associée à la fois à des infections chroniques par la formation de biofilm et aiguës par la sécrétion de nombreux facteurs de virulence. De plus, c'est une bactérie qui possède un très grand génome, lui permettant d'exprimer un arsenal d'éléments tels que des TCS ou des régulateurs transcriptionnels, qui contribuent à sa grande capacité d'adaptation dans des environnements très variés (**Chevalier et al.**, 2019; **Rodrigue et al.**, 2000). Lors d'une infection, les bactéries sont exposées à un nombre important de molécules eucaryotes telles que des cytokines, des hormones ou des neurotransmetteurs (**Lesouhaitier et al.**, 2009). Celles-ci peuvent impacter les interactions établies entre l'hôte et le pathogène (**P. P. E. Freestone et al.**, 2008). C'est par exemple le cas des catécholamines (dopamine, norépinéphrine, épinéphrine) qui sont libérées lors d'un stress, d'un trauma (**Crum et al.**, 1988; **Udupa**, 1978), à la suite d'une activité physique, ou encore utilisées lors d'un traitement médical. Comme cela a été décrit dans l'introduction bibliographique de ce manuscrit, les catécholamines sont capables de moduler la physiologie de nombreuses bactéries à Gram négatif (croissance, mobilité, formation de biofilm, virulence). Chez *P. aeruginosa* PA14, il a été montré que la norépinéphrine module la virulence et la mobilité de la bactérie, et que le système *Las* pourrait être impliqué dans la réponse à cette molécule (**Hegde et al.,** 2009). Une autre étude, réalisée sur la souche *P. aeruginosa* PAO1, a permis de mettre en évidence que la norépinéphrine peut inhiber la production de sidérophores chez cette bactérie, ainsi que l'expression du gène *toxA* codant pour l'exotoxine A, un facteur de virulence important (**Li et al.,** 2009).

A côté de ces travaux sur la norépinéphrine, il existe très peu d'informations concernant l'impact de l'épinéphrine sur *P. aeruginosa* disponibles dans la bibliographie. C'est dans ce

contexte, que mes travaux de thèse ont eu pour objectif d'étudier l'effet de cette molécule sur *P. aeruginosa*. La première partie de mes travaux de thèse s'est donc focalisée sur l'effet de l'épinéphrine sur la mobilité de *P. aeruginosa*, son adhésion sur des surfaces biotiques et abiotiques, sa capacité à former un biofilm dans des conditions dynamiques et sa virulence envers le modèle *Galleria mellonella*. Ces résultats ont fait l'objet d'un article scientifique soumis dans le journal *Scientific Reports*, et qui est actuellement en révision (Article 1). Des résultats complémentaires non publiés seront également présentés dans ce chapitre à la suite de l'article.

II. Article 1

Epinephrine affects motility, and increases adhesion, biofilm and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* H103

Mélyssa Cambronel[1], Damien Tortuel[1], Kelly Biaggini[1], Olivier Maillot[1], Laure Taupin[2], Karine Réhel[2], Isabelle Rincé[3], Cécile Muller[3], Julie Hardouin[4], Marc Feuilloley[1], Sophie Rodrigues[1], Nathalie Connil*[1]

En révision pour le journal Scientific Reports (SREP-19-31418)

SCIENTIFIC REPORTS
natureresearch

OPEN

Epinephrine affects motility, and increases adhesion, biofilm and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* H103

Mélyssa Cambronel[1], Damien Tortuel[1], Kelly Biaggini[1], Olivier Maillot[1], Laure Taupin[2], Karine Réhel[2], Isabelle Rincé[3], Cécile Muller[3], Julie Hardouin[4], Marc Feuilloley[1], Sophie Rodrigues[1] & Nathalie Connil[1*]

Microbial endocrinology has demonstrated for more than two decades, that eukaryotic substances (hormones, neurotransmitters, molecules of the immune system) can modulate the physiological behavior of bacteria. Among them, the hormones/neurotransmitters, epinephrine (Epi) and norepinephrine (NE), released in case of stress, physical effort or used in medical treatment, were shown to be able to modify biofilm formation in various bacterial species. In the present study, we have evaluated the effect of Epi on motility, adhesion, biofilm formation and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*, a bacterium linked to many hospital-acquired infections, and responsible for chronic infection in immunocompromised patients including persons suffering from cystic fibrosis. The results showed that Epi increased adhesion and biofilm formation of *P. aeruginosa*, as well as its virulence towards the *Galleria mellonella* larvae *in vivo* model. Deciphering the sensor of this molecule in *P. aeruginosa* and the molecular mechanisms involved may help to find new strategies of treatment to fight against this bacterium.

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative opportunistic pathogen known for its implication in many hospital-acquired infections and in immunocompromised patients suffering from cystic fibrosis[1]. Furthermore, it is a pathogen of concern, since it was classed as critical by the World Health Organization in 2017, due to its antibiotic resistance. The pathogenicity of this bacterium is associated with its capacity to induce chronic infections (strong biofilms, which are difficult to treat) and acute infections where many virulence factors can be secreted. *P. aeruginosa* possesses a large genome (6.3 million base pairs) including many regulatory two-component systems and transcriptional regulators which contribute to its remarkable environmental adaptability[2,3].

During host infection, bacteria are exposed to many eukaryotic substances such as immune system molecules (interleukin), peptides hormones (CNP, substance P) and neurotransmitters (GABA)[4]. Molecules released under host stress can influence host-pathogens interactions and bacterial pathogenicity[5]. Stress, trauma[6,7], physical effort and therapy utilization of inotropes leads to the presence of catecholamines in the human body, which gather three endogenous molecules: dopamine, norepinephrine (NE) and epinephrine (Epi). These substances were found to be able to modulate the growth of Gram-negative pathogens like *Escherichia coli*[8], *Vibrio cholerae*[9], *Helicobacter pylori*[10], *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica*[11]. Furthermore, some bacteria increased their virulence when exposed to catecholamines such as *Vibrio harveyi*, which was more virulent towards brine shrimp larvae, following a treatment with NE or dopamine[12]. The motility and capacity to form biofilm of *Escherichia coli* O157:H7 and *V. harveyi* were also found to be enhanced in presence of catecholamines[12,13]. In *P. aeruginosa* PA14, NE modulates the virulence and motility of the bacterium, and the *las* quorum-sensing pathway may be involved in the response towards this molecule[14]. In another study conducted on *P. aeruginosa*, strain PAO1, the

[1]Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) EA 4312, Normandie Université – Université de Rouen, Évreux, 27000, Evreux, France. [2]Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM) EA 3884, IUEM, Université de Bretagne-Sud, 56100, Lorient, France. [3]Unité de Recherche Risques Microbiens (U2RM), EA 4655, UFR des sciences, Normandie Université, Université de Caen, 14000, Caen, France. [4]Laboratoire Polymères, Biopolymères, Surfaces, UMR 6270 CNRS, Plateforme Protéomique, PISSARO, Normandie Université, Université de Rouen, 76130, Mont Saint Aignan, France. *email: nathalie.connil@univ-rouen.fr

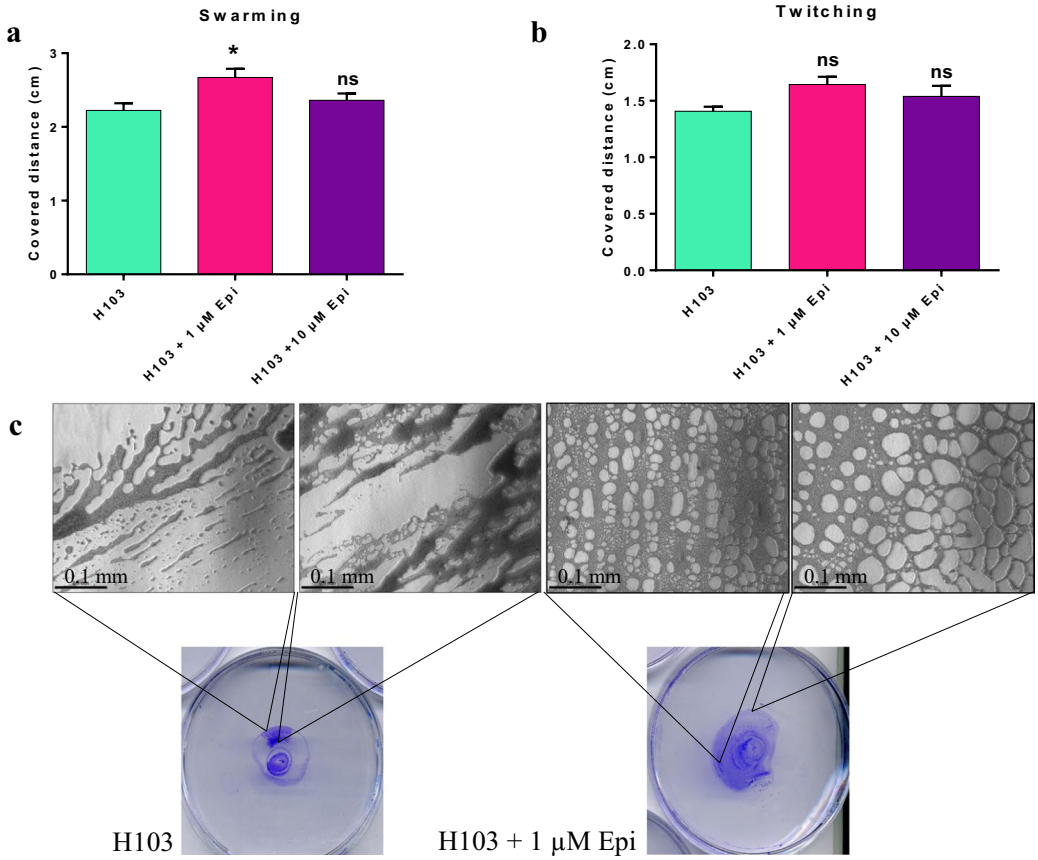


Figure 1. Effect of Epi on *P. aeruginosa* H103 motility. (**a**) Covered distance by swarming motility on LB 0.6% agar, after 24 h, (**b**) Covered distance by twitching motility on LB 1% agar, (**c**) Macroscopic and microscopic observations of twitching. Micrographs were taken with an Axio Vert A.1 inverted microscope, scale bar: 0.1 mm. The error bars indicate the standard error of the mean (SEM). Two-tailed paired *t*-test was used, (n = 6 and n = 3 for swarming and twitching assays respectively), $*p = 0.0125$, ns: not significant.

authors showed that NE was able to repress the production of siderophore and the expression of *toxA* coding an important virulence factor exotoxin A[15], rather than enhancing virulence production as seen with other bacteria.

Contrary to NE, prior to this study, very little information was available concerning the behavior of *P. aeruginosa* exposed to Epi. In this context, the aim of our study was to investigate the effect of this molecule on *P. aeruginosa* motility, adhesion, biofilm formation and virulence.

Results

Motility of *P. aeruginosa* H103. As motility was found to be modified in a large amount of Gram-negative bacteria after exposure to NE or Epi[13,16–19], we decided to study this effect on *P. aeruginosa* H103 (Fig. 1). The results obtained showed that the radial growth of swarming phenotype was increased in presence of 1 µM Epi (Fig. 1a) and the twitching motility was qualitatively modulated (Fig. 1b). Indeed, the microscopic observation revealed that in presence of Epi, the twitching of *P. aeruginosa* H103 seemed to form a more well-organized network, compared to the untreated bacteria (Fig. 1c). As type IV pili can be involved in swarming and twitching of *P. aeruginosa* H103[20,21], we then completed this study by using PO4 phage, which effect on *P. aeruginosa* H103 is highly dependent on type IV pili.

PO4 phage sensitivity of *P. aeruginosa* H103. Bacteriophages require a specific component of bacteria for host infection, like lipopolysaccharides for the phage PaP1[22] or proteins on the bacterial surface. PO4 bacteriophages bind to the type IV pili of *P. aeruginosa*. To test the hypothesis of modulation of type IV pili in presence of Epi, a double agar overlay plaque assay was carried out. The results of this experiment, presented on Fig. 2, showed that *P. aeruginosa* H103 was more sensitive to the PO4 bacteriophage in presence of Epi. Indeed, the number of lysis plaque was higher when treated with 1 and 10 µM Epi, leading to 3.27-fold increase ± 0.5, and 1.24 ± 0.05, respectively. This means that when *P. aeruginosa* H103 was in contact with Epi, its sensitivity towards the PO4 phage was enhanced. This result reinforces the hypothesis that Epi may modify the type IV pili structure resulting in the modification of motility observed above.

Adhesion of *P. aeruginosa* H103. Adhesion to a surface is the first step which allows bacteria to colonize an environment and thereafter, to form biofilm. Bacteria possess many components that help them to adhere on surfaces, like adhesin or the type IV pili. In this work, we investigated the effect of 1 and 10 µM Epi on adhesion

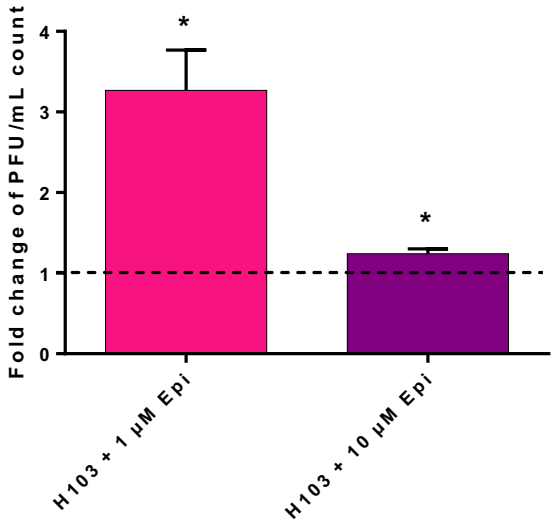


Figure 2. Effect of Epi on phage PO4 sensitivity. Phage PO4 sensitivity towards *P. aeruginosa* H103 was tested in presence of 1 and 10 µM of Epi after 24 h. Plaque lysis were enumerated and expressed in PFU/mL, fold change is expressed for each condition. The error bars indicate the standard error of the mean (SEM). Two-tailed paired *t*-test was used (n = 4), $*p = 0.025$.

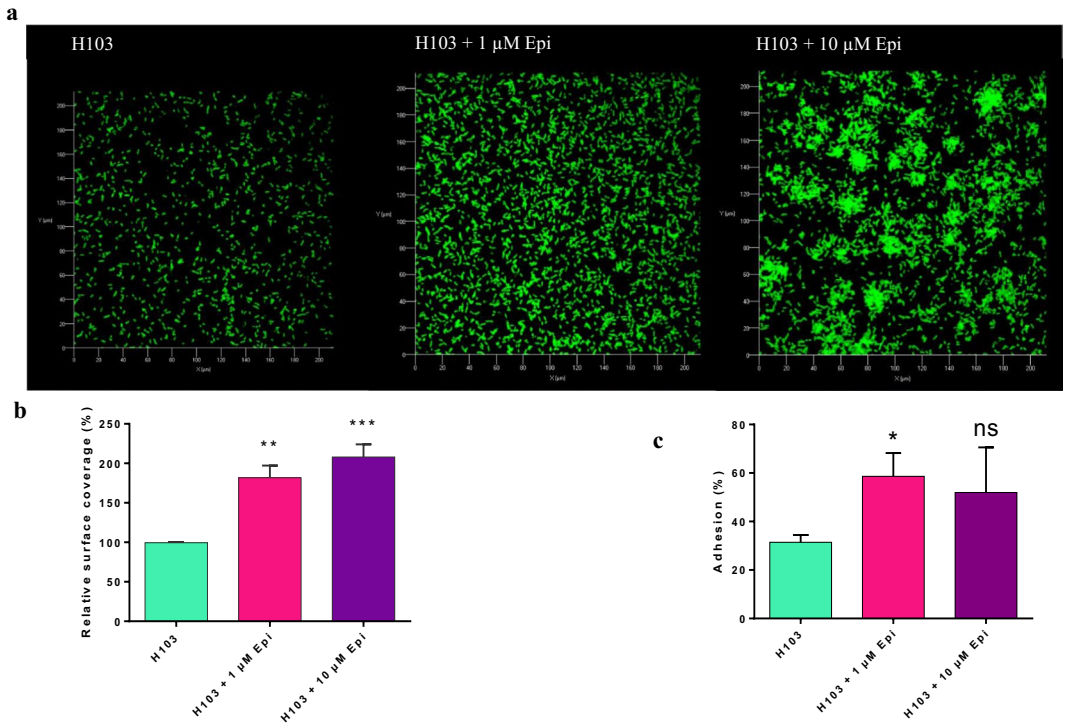


Figure 3. Effect of Epi on adhesion of *P. aeruginosa* H103. (**a**) Top view of *P. aeruginosa* H103-GFP adhesion observed by CLSM with two different concentrations of Epi (1 and 10 µM), after 2 h. (**b**) Image analysis by COMSTAT. Data were normalized according to the untreated control set at 100%. (**c**) Adhesion assay on Caco-2/TC7 cells, $*p = 0.0418$. The error bars indicate the standard error of the mean (SEM). Two-tailed paired *t*-test was used (n = 5), $**p = 0.001222$, $***p = 0.000413$, ns: not significant.

of *P. aeruginosa* H103 to abiotic and biotic surfaces. The results obtained are presented on Fig. 3. A COMSTAT analysis showed that *P. aeruginosa* H103 displayed an increased surface coverage (181% ± 15%) when treated with 1 µM of Epi, compared to control (Fig. 3b). A higher concentration (10 µM of Epi) also increased the covered surface of *P. aeruginosa* H103 (207% ± 16%) (Fig. 3b). Moreover, *P. aeruginosa* H103 seems to form aggregates when treated with 10 µM of Epi (Fig. 3a).

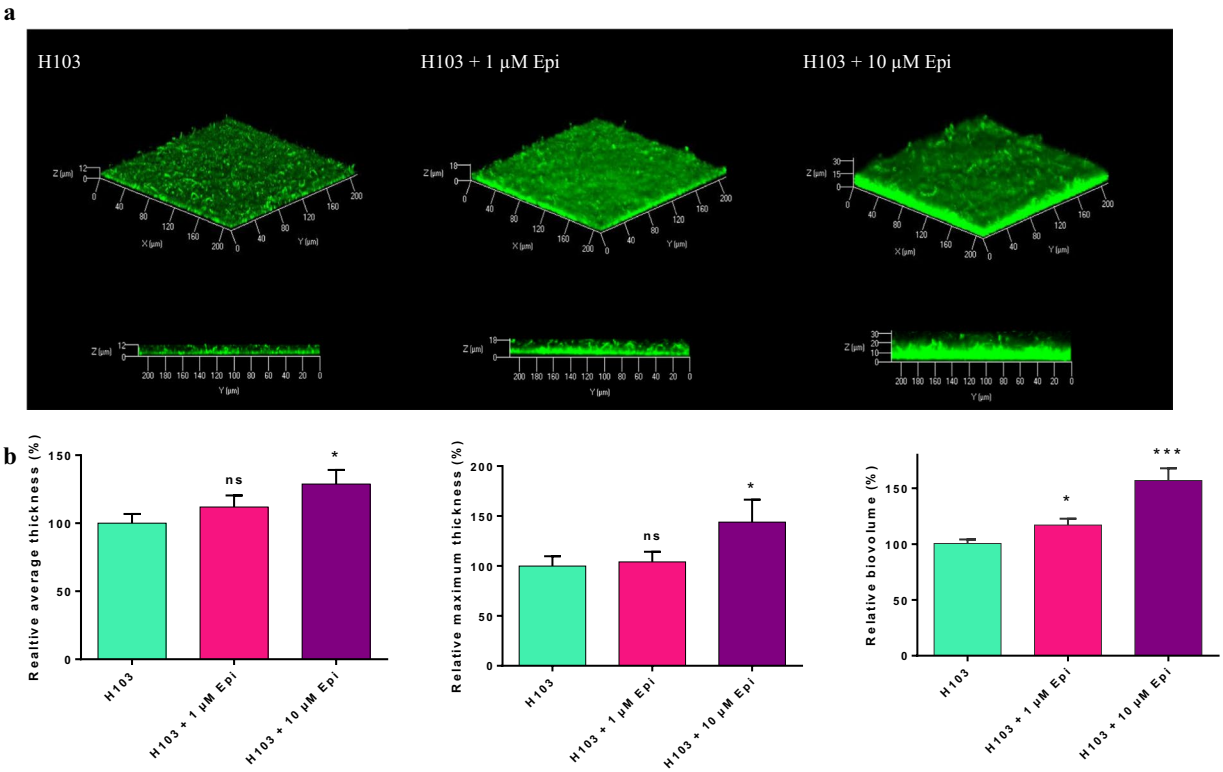


Figure 4. Effect of Epi on *P. aeruginosa* H103 biofilm formation. (**a**) Three dimensional (3D) and side views of *P. aeruginosa* H103-GFP 24 h biofilm observed by CLSM, in presence of 1 or 10 µM of Epi. (**b**) Images analysis by COMSTAT. Data were normalized according to the untreated control set at 100%. The error bars indicate the standard error of the mean (SEM) of at least three independent experiments. Two-tailed paired *t*-test was used (n = 4), $*p < 0.05$, $***p < 0.001$, ns: not significant.

The capacity of *P. aeruginosa* H103 to adhere on biotic surface was then evaluated on Caco-2/TC7 cell line after 2 h of contact (Fig. 3c). The results showed that 1 µM of Epi significantly enhanced the capacity of the bacteria to adhere to these cells (58% ± 9.6%) compared to control (31% ± 3%).

Biofilm formation of *P. aeruginosa* H103. A flow-cell device with glass surface was used to investigate the biofilm formation of *P. aeruginosa* H103 in dynamic conditions to mimic *in vivo* conditions (Fig. 4). For both concentrations of Epi (1 and 10 µM) administrated continuously during biofilm formation, no modifications of biofilm architecture were observed compared to control (Fig. 4a). However, images analysis using COMSTAT software showed that average and maximum thicknesses were significantly increased in presence of 10 µM Epi compared to untreated biofilm, with +29% ± 10% ($p = 0.0450$) and +44% ± 22% ($p = 0.0140$), respectively. No significant difference of the average and maximum thicknesses were observed with 1 µM of Epi, but the biovolume reflecting the bacterial biomass was increased with +18% ± 5.7% ($p = 0.0205$) when exposed to 1 µM of this molecule and by +57% ± 11.4% ($p < 0.0001$) for 10 µM Epi (Fig. 4b).

Virulence of *P. aeruginosa* H103 towards *G. mellonella*. The pathogenicity of *P. aeruginosa* H103 treated or not with 1 or 10 µM Epi was assessed with the *in vivo* model *G. mellonella*, which has been developed in recent years, as an alternative to murine or other vertebrate models of infection to contribute to the 3Rs (reduction, replacement, and refinement) of animal use in scientific research. The results of this experiment, presented on Fig. 5, showed that the mortality of the larvae was accelerated when bacteria were treated and co-injected with 10 µM Epi. Indeed, only 31% of the larvae remained alive at 13 h post-infection in the 10 µM Epi treated conditions compared to 58% of survival for infection with the pathogen alone. On the contrary, a treatment with 1 µM Epi had no effect on pathogenicity of *P. aeruginosa* H103. A control negative was also used to be sure that Epi had no direct effect on larvae mortality.

Discussion

Bacteria can be exposed to a multitude of host cell molecules such as catecholamines[7] that could enhance the growth of many gram-negative bacteria[8,9,12,17,18,23–26] as well as their virulence[19,27]. Till now, only few studies were conducted on the effect of these molecules on *P. aeruginosa*, which is an opportunistic pathogen, often found in hospital-acquired infections. Freestone and collaborators[28] have shown that inotropes (dopamine, Epi and NE) are able to increase the biofilm formation of *P. aeruginosa*. Hedge *et al.*[14] showed that NE increases *P. aeruginosa* PA14 virulence through the *las* quorum-sensing pathway by inducing, among others, the expression of *lasA* and *lasB*. Li *et al.*[15] demonstrated that NE decreased siderophore production and *toxA* expression in PAO1.

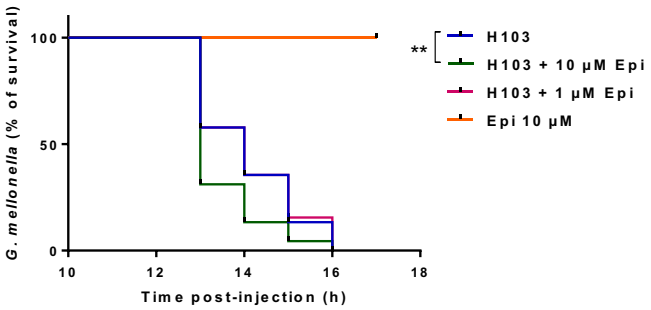


Figure 5. Virulence assay on *G. mellonella*. The virulence of *P. aeruginosa* H103 was tested towards the caterpillar *G. mellonella* larvae, during 17 h. Log-rank (Mantel-Cox) test was used, $**p = 0.0086$.

Epi and catecholamines in general, can promote bacterial motility. In the present study, we showed that the swarming seemed to be slightly affected only at 1 µM Epi; moreover, the twitching motility displayed modifications in microscopic phenotype. In previous work, we have already observed that the swarming of *P. fluorescens* can also be affected by exposure to 1 µM Epi[29]. Twitching motility of *P. aeruginosa* PA14 strain was increased by Epi[28]. The present work showed that the stimulation of the twitching and the sensitivity to the PO4 bacteriophage are connected. Indeed, the PO4 phage needs the type IV pili to infect our strain[30], and we saw that Epi enhance the intensity of the twitching, which indirectly measure the type IV pili function[31]. Production of rhamnolipids (another structure that can be involved in motility) has been quantified (Supplementary data 1) and no differences between treated and control conditions have been observed, reinforcing the hypothesis that the effect of Epi on motility may come from the type IV pili or the flagellum.

We demonstrated that upon exposure to Epi (1 and 10 µM), *P. aeruginosa* H103 adhesion on abiotic surface was increased and a concentration of 10 µM of Epi led to bacterial cell-cell attachment and microcolony formation. Lyte *et al.* (2003) demonstrated that adhesion of *Staphylococcus epidermidis* on polystyrene and silicon was increased upon addition to catecholamines inotropes (dopamine and NE)[32]. These authors also found the presence of bacterial aggregates following a microscopic evaluation of the biofilm. An enhancement of a specific biofilm exopolysaccharides production was proposed as an explanation for these phenomena. Attachment to surface was studied with *P. aeruginosa* PA14 on endotracheal tubes and the presence of cell-cell attachment was described as well[28].

Biofilms enhance bacterial growth and survival by providing access to nutrients and provide protection from host immune system molecules and antimicrobial compounds. Furthermore, pathogenicity is often closely related to bacterial biofilm formation[33–35]. In the present study, we have examined the biofilm formation of *P. aeruginosa* under a continuous exposure (24 h) of Epi in dynamic conditions (i.e. flow cell system). We have observed an increased biovolume or thickness in presence of 1 or 10 µM of this molecule. None of these concentrations affected the growth of *P. aeruginosa* (Supplementary data 2). Freestone and collaborators (2012) also described an increased capacity of *P. aeruginosa* to form biofilm on eukaryotic cells and on endotracheal tube[28] when treated with Epi on serum-SAPI medium, which mimics more closely the *in vivo* conditions. Other authors also showed an increase of biofilm formation when treated with catecholamines inotropes[12,13,32,36].

The mechanism by which Epi could increase biofilm formation remains unclear. We can hypothesize that the impact of Epi on the type IV pili could contribute to the increase of adhesion and then biofilm formation. The type IV pili play an important role in the establishment of bacterial adhesion on abiotic surface (twitching motility) as well as in the development of microcolony and is required for biofilm formation by *P. aeruginosa*[37–40].

The increasing ability of *P. aeruginosa* H103 to form biofilm when exposed to Epi suggested a role of this stress hormone in virulence. In our case, Epi at 10 µM significantly increased *P. aeruginosa* virulence towards *G. mellonella*. Similarly, Yang *et al.*, (2014) demonstrated that catecholamines could enhance the virulence of pathogenic bacteria (*Vibrio harveyi)* towards a gnotobiotic brine shrimp larvae model[12]. Other authors studied the virulence of *Vibrio campbellii* BB120 toward giant freshwater prawn larvae, and showed that NE and dopamine were able to modulate the virulence of this bacterium[17]. In the prawn larvae model, the virulence can be increased by the production of extracellular protease[41] and by the utilization of the type III secretion system[42].

The interaction between bacteria and the host depends on their capacity to communicate. The production of catecholamines, which can occur after a trauma, stress or a physical effort, influences the bacterial pathogenicity[6]. Bacteria have adapted to their environment by developing various mechanisms, and two-component system is one of them. In *E. coli* O157:H7, two different systems, QseC/QseB and QseE/QseF have been described for their implication in sensing the presence of Epi or NE[43–45]. Other alternative adrenergic receptors have been found in organisms such as *S. Typhimurium* (BasS/R) or in *S. enterica* serovar Typhi[46] (CpxA/R). To our knowledge, no adrenergic sensors have been identified in *P. aeruginosa* up to now. Investigations regarding the presence of homologous sequences to QseC in *P. aeruginosa* H103 have been performed in our laboratory. Some putative catecholamines receptors are now considered for further research. Deciphering the mechanism by which pathogenic bacteria are able to respond to host stress hormones could help understand how the signal is perceived and transduced, and the pathways impacted by these molecules. Proteomic analysis of *P. aeruginosa* H103 treated with Epi will also help us to discover how Epi acts on bacteria. *P. aeruginosa* can be present and responsible for skin, lung or intestine infections, where many eukaryotic substances are secreted; it is necessary to develop a way to prevent these phenomena to happen. Finding new therapeutic strategies could help to block bacterial capacity to perceive these eukaryotic signals and may reduce virulence.

Materials and Methods

Bacterial strains and growth conditions. The bacteria used in this study were *P. aeruginosa* H103 (PAO1 derivative strain)[47] and the H103-GFP strain tagged with the green fluorescent protein (GFP)-encoding pHC60 plasmid (*gfp*, tet^R)[48]. They were routinely grown at 37 °C under a rotary shaker (180 rpm) in Luria Bertani (LB) medium (containing 5 g/L NaCl). Depending on the assay, cultures were exposed to Epi (Sigma-Aldrich) from 1 to 10 µM. Tetracycline was used at 125 µg/mL for the culture of H103-GFP strain.

Motility assays. Swarming and twitching motility were tested on LB with 0.6% and 1% (w/v) agar, respectively, and containing 1 µM or 10 µM as previously described[49,50]. Swarming plates were inoculated using a bacterial suspension spotted on the surface and incubated for 24 h at 37 °C. For twitching assay, the suspension was spotted underneath the agar layer. After 24 h at 37 °C, agar was removed, and cells attached to the Petri dish bottom were stained with crystal violet 0.4%. Micrographs were taken using a Zeiss Axio Vert A.1 inverted microscope (x40) (Zeiss, Germany) with a QImaging QIClick camera and Q-capture pro 7 software (QImaging, Canada). For both motility assays, each experiment was conducted three times with at least three biological replicates by test.

PO4 phage sensitivity assay. Sensitivity of PO4 bacteriophage towards *P. aeruginosa* H103 was tested in 1.5% LB agar plate, with or without Epi. The double agar overlay method was used for the first step of phage isolation and later for precise titration of phage suspension[51]. Dilutions of phage suspension were mixed with 100 µl of *P. aeruginosa* H103 (10^8 CFU/mL) in molted agar (supplemented or not with 1 µM or 10 µM Epi) and then poured on the top of LB agar plate. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. Lysis plaques were then counted, and results were expressed in PFU/mL. Data were obtained from four independent experiments.

Biofilm culture. Biofilms grown under hydrodynamic conditions were performed in a three channel flow cell (1 × 40 × 44 mm; Biocentrum, DTU, Danemark)[52]. The flow system was assembled, prepared and sterilized as described by Tolker-Nielsen and Sternberg[53]. The substratum consisted of a microscope glass coverslip (24 × 50 st1 [Knittel Glasser, Germany]). Each channel was inoculated with 250 µl of an overnight culture of *P. aeruginosa* H103 diluted to an OD_{580} of 0.1 (10^8 CFU/mL) in physiological water (NaCl 0.9%). A two-hour attachment step was performed without any flow. A flow (2.5 mL/h) of LB medium with or without Epi (1 and 10 µM) was then applied for 24 h using a Watson Marlow 205U peristaltic pump (Watson Marlow, UK). The attached bacteria or biofilms were observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) as described below.

Confocal laser scanning microscopy (CLSM). Biofilm observations were performed with a Zeiss LSM710 (Zeiss, Germany) using a 40x oil immersion objective. Bacteria were detected by monitoring the GFP fluorescence. GFP was excited at 488 nm and fluorescence emission was detected between 500 and 550 nm. Images were taken every micrometer throughout the whole biofilm depth. For visualization and processing of three-dimensional (3D) image data, the Zen 2.1 software (Zeiss, Germany) was used. Quantitative analyses of image stacks were performed using the COMSTAT software (http://www.imageanalysis.dk/)[54]. For bacterial adhesion, the percentage of covered surface was determined using ImageJ software[55]. At least three image stacks from each of three independent experiments (nine stacks in total) were used for each analysis.

***Galleria mellonella* virulence assay.** *P. aeruginosa* H103 strain, used for infection of *G. mellonella*, were grown in LB supplemented with 1 or 10 µM Epi, for 6 h (late exponential phase). After centrifugation, bacterial cells were washed once in physiological water (NaCl 0.9%) and resuspended to a final concentration of 10^5 CFU/mL. The size of the inoculum was confirmed by numeration on solid LB. Fifteen larvae were infected with 10 µL of a cell suspension, supplemented or not with Epi, into the hemocoel using a microinjector (KDS100 Legacy, Fisher Scientific) with a sterilized microsyringe[56,57]. Larva were incubated at 37 °C and survival was monitored during 17 h post-infections.

Cells cultures. The human colon adenocarcinoma Caco-2/TC7 cells were grown in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) containing 15% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), and penicillin/streptomycin (100 µg/mL). Cells were cultivated at 37 °C, in 5% CO_2 - 95% air atmosphere and the medium was regularly changed. For adhesion assays, cells were seeded in 24 wells plates treated for tissue culture and used at confluence.

Adhesion. Adhesion of *P. aeruginosa* H103 on intestinal Caco-2/TC7 cells was investigated according to Baccouri *et al.*[56] including some modifications. Bacteria were grown for 6 h in LB supplemented with 1 or 10 µM Epi (late exponential phase), then collected by centrifugation at 8000 x g for 10 min. The pellets were resuspended in DMEM without FBS and antibiotics, added on the confluent intestinal cells at a MOI of 100 bacteria per cell, and allowed to adhere. After 2 h of adhesion, Caco-2/TC7 cells were washed twice with PBS (Phosphate Buffer Saline) to remove planktonic bacteria, and then disrupted with 0.1% triton 100x. The lysates were then diluted and plated on LB agar, to determine the number of adherent bacteria.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism (GraphPad Prism 8.1.2; GraphPad Software, San Diego, California, USA). For the *G. mellonella* killing assay, larvae survival was calculated by the Kaplan-Meier method, and survival differences were tested for significance using the log rank test. In all other assays, *t*-test were used to compare the means within the same set of experiments. Statistical significance was determined at $p < 0.05$.

Received: 6 August 2019; Accepted: 4 December 2019;
Published online: 27 December 2019

References

1. Ramsey, D. M. & Wozniak, D. J. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol. Microbiol* **56**, 309–322 (2005).
2. Chevalier, S. *et al*. Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech* **1862**, 706–721 (2019).
3. Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Méjean, V. & Foglino, M. Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol.* **8**, 498–504 (2000).
4. Lesouhaitier, O. *et al*. Gram-negative bacterial sensors for eukaryotic signal molecules. *Sensors (Basel).* **9**, 6967–6990 (2009).
5. Freestone, P. P. E., Sandrini, S. M., Haigh, R. D. & Lyte, M. Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection. *Trends Microbiol.* **16**, 55–64 (2008).
6. Crum, R., Borrow, B., Shackford, S., Hansbrough, J. & Brown, M. R. The neurohumoral response to burn injury in patient resuscitated with hypertonic saline. *J. Trauma* **28**, 1181–1187 (1988).
7. Udupa, K. N. The neurohumoral response to trauma. *Am. J. Surg.* **135**, 403–405 (1978).
8. Lyte, M. & Ernst, S. Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life Sci.* **50**, 203–212 (1992).
9. Halang, P. *et al*. Response of *Vibrio cholerae* to the catecholamine hormones. *J. Bacteriol.* **197**, 3769–3778 (2015).
10. Doherty, N. C., Tobias, A., Watson, S. & Atherton, J. C. The effect of the human gut-signalling hormone, norepinephrine, on the growth of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **14**, 223–230 (2009).
11. Freestone, P. P. E., Haigh, R. D. & Lyte, M. Blockade of catecholamine-induced growth by adrenergic and dopaminergic receptor antagonists in *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica*. *BMC Microbiol.* **7**, 1–13 (2007).
12. Yang, Q., Anh, N. D. Q., Bossier, P. & Defoirdt, T. Norepinephrine and dopamine increase motility, biofilm formation, and virulence of *Vibrio harveyi*. *Front. Microbiol* **5**, 1–12 (2014).
13. Bansal, T. *et al*. Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infect. Immun.* **75**, 4597–4607 (2007).
14. Hegde, M., Wood, T. K. & Jayaraman, A. The neuroendocrine hormone norepinephrine increases *Pseudomonas aeruginosa* PA14 virulence through the las quorum-sensing pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 763–776 (2009).
15. Li, W. *et al*. Norepinephrine represses the expression of toxA and the siderophore genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **71**, 3831–3840 (2009).
16. Bearson, B. L. & Bearson, S. M. D. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb. Pathog.* **44**, 271–278 (2008).
17. Pande, G. S. J., Suong, N. T., Bossier, P. & Defoirdt, T. The catecholamine stress hormones norepinephrine and dopamine increase the virulence of pathogenic *Vibrio anguillarum* and *Vibrio campbellii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **90**, 761–769 (2014).
18. Intarak, N., Muangsombut, V., Stevens, M. P., Korbsrisate, S. & Vattanaviboon, P. Growth, motility and resistance to oxidative stress of the melioidosis pathogen *Burkholderia pseudomallei* are enhanced by epinephrine. *Pathog. Dis* **72**, 24–31 (2014).
19. Torabi Delshad, S., Soltanian, S., Sharifiyazdi, H. & Bossier, P. Effect of catecholamine stress hormones (dopamine and norepinephrine) on growth, swimming motility, biofilm formation and virulence factors of *Yersinia ruckeri in vitro* and an *in vivo* evaluation in rainbow trout. *J. Fish Dis* **42**, 477–487 (2019).
20. Burrows, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**, 493–520 (2012).
21. Talà, L., Fineberg, A., Kukura, P. & Persat, A. *Pseudomonas aeruginosa* orchestrates twitching motility by sequential control of type IV pili movements. *Nat. Microbiol* **4**, 774–780 (2019).
22. Li, G. *et al*. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to phage PaP1 predation via O-antigen polymerase mutation. *Front. Microbiol* **9**, 1–10 (2018).
23. Nakano, M. *et al*. Catecholamine-induced stimulation of growth in *Vibrio* species. *Lett. Appl. Microbiol.* **44**, 649–653 (2007).
24. Freestone, P. P., Haigh, R. D., Williams, P. H. & Lyte, M. Stimulation of bacterial growth by heat-stable, norepinephrine-induced autoinducers. *FEMS Microbiol. Lett* **172**, 53–60 (1999).
25. Williams, P. H. *et al*. Stress and the periodontal diseases: effects of catecholamines on the growth of periodontal bacteria *in vitro*. *Oral Microbiol. Immunol.* **17**, 296–303 (2003).
26. Li, L. *et al*. Catecholamines promote *Actinobacillus pleuropneumoniae* growth by regulating iron metabolism. *PLoS One* **10**, e0121887 (2015).
27. Gao, J. *et al*. The stress hormone norepinephrine increases the growth and virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Microbiologyopen* **8**, e00664 (2019).
28. Freestone, P. P. *et al*. *Pseudomonas aeruginosa* -catecholamine inotrope interactions: a contributory factor in the development of ventilator-associated pneumonia? *Chest* **142**, 1200–1210 (2012).
29. Biaggini, K. *et al*. The pathogenic potential of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 on enterocytes can be modulated by serotonin, substance P and epinephrine. *Arch. Microbiol.* **3**, 983–990 (2015).
30. Bradley, D. E. Basic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* pilus-dependent bacteriophage with a long noncontractile tail. *J. Virol.* **12**, 1139–1148 (1973).
31. McCutcheon, J. G., Peters, D. L. & Dennis, J. J. Identification and characterization of type IV Pili as the cellular receptor of broad host range *Stenotrophomonas maltophilia* bacteriophages DLP1 and DLP2. *Viruses* **10**, E338 (2018).
32. Lyte, M. *et al*. Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes. *Lancet* **361**, 130–135 (2003).
33. Parsek, M. R. & Singh, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 677–701 (2003).
34. Hassett, D. J. *et al*. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections in cystic fibrosis: insights into pathogenic processes and treatment strategies. *Expert Opin. Ther. Targets* **14**, 117–130 (2010).
35. Bjarnsholt, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS* **121**, 1–58 (2013).
36. Sandrini, S., Alghofaili, F., Freestone, P. & Yesilkaya, H. Host stress hormone norepinephrine stimulates pneumococcal growth, biofilm formation and virulence gene expression. *BMC Microbiol.* **14**, 1–12 (2014).
37. Klausen, M. *et al*. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol* **48**, 1511–1524 (2003).
38. O'Toole, G. A. & Kolter, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol* **30**, 295–304 (1998).
39. Jenkins, A. T. A., Buckling, A., McGhee, M. & ffrench-Constant, R. H. Surface plasmon resonance shows that type IV pili are important in surface attachment by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. R. Soc. Interface* **2**, 255–259 (2005).
40. Craig, L., Pique, M. E. & Tainer, J. A. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 363–378 (2004).
41. Andrejko, M., Zdybicka-Barabas, A. & Cytryńska, M. Diverse effects of *Galleria mellonella* infection with entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Invertebr. Pathol.* **115**, 14–25 (2014).
42. Miyata, S., Casey, M., Frank, D. W., Ausubel, F. M. & Drenkard, E. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect. Immun.* **71**, 2404–2413 (2003).

43. Zhu, C., Sperandio, V., Boedeker, E. C., Hughes, D. T. & Clarke, M. B. The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 10420–10425 (2006).
44. Rasko, D. A. *et al*. Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. *Science* **321**, 1078–1080 (2008).
45. Reading, N. C. *et al*. A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin. *J. Bacteriol* **189**, 2468–2476 (2007).
46. Karavolos, M. H., Winzer, K., Williams, P. & Khan, C. M. A. Pathogen espionage: multiple bacterial adrenergic sensors eavesdrop on host communication systems. *Mol. Microbiol.* **87**, 455–465 (2013).
47. Hancock, R. E. & Carey, A. M. Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat- 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. *J. Bacteriol.* **140**, 902–910 (1979).
48. Cheng, H. P. & Walker, G. C. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **180**, 5183–5191 (1998).
49. Turnbull, L. & Whitchurch, C. B. Motility assay: twitching motility. *Methods Mol. Biol* **1149**, 73–86 (2014).
50. Ha, D.-G., Kuchma, S. L. & O'Toole, G. A. Plate-based assay for swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Mol. Biol* **1149**, 67–72 (2014).
51. Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E. & Johnson, R. P. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods. Mol. Biol.* **501**, 69–76 (2009).
52. Pamp, S. J., Sternberg, C. & Tolker-Nielsen, T. Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. *Cytom. Part A* **75A**, 90–103 (2009).
53. Tolker-Nielsen, T. & Sternberg, C. Growing and analyzing biofilms in flow chambers. *Curr. Protoc. Microbiol.* **21**, 1B.2.1–1B.2.17 (2011).
54. Heydorn, A. *et al*. Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. *Microbiology* **146**, 2395–2407 (2015).
55. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
56. Baccouri, O. *et al*. Probiotic potential and safety evaluation of *Enterococcus faecalis* OB14 and OB15, isolated from traditional tunisian testouri cheese and rigouta, using physiological and genomic analysis. *Front. Microbiol* **10**, 881 (2019).
57. Koch, G., Nadal-Jimenez, P., Cool, R. H. & Quax, W. J. Assessing *Pseudomonas* virulence with nonmammalian host: *Galleria mellonella*. *Methods Mol. Biol.* **1149**, 681–688 (2014).

Acknowledgements
We wish to thank Rikki Knowlton, native English speaker for editing our manuscript. Mélyssa Cambronel was recipient of a doctoral fellowship from the French Ministry of Research (MRT). This work was supported by grants from the Evreux Portes de Normandie Agglomeration, the Région Normandie and European Union (FEDER).

Author contributions
S.R., J.H., M.F., N.C., conceived and designed the experiments. M.C., S.R. and N.C. carried out most of the experiments and analyzed the data. M.C. realized and analyzed bacterial motility experiments. M.C. and D.T. performed phage experiments. S.R. helped for adhesion and biofilm experiments with flow-cell device. M.C., K.B., N.C. performed adhesion on eukaryotic cells. M.C., S.R., L.T. and K.R. extracted and analyzed rhamnolipdids. I.R., C.M., M.C., S.R. and D.T. performed the virulence test on *G. mellonella* model. O.M. contributed to technical assistance. M.C., S.R. and N.C. wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Additional information
Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-019-56666-7.

Correspondence and requests for materials should be addressed to N.C.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2019

III. Résultats complémentaires

1. Effet sur le swimming

Comme décrit dans l'article 1, l'épinéphrine (1 µM) stimule la mobilité de type swarming, et modifie l'aspect et l'intensité de coloration de la mobilité de type twitching. Pour compléter ces données, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'épinéphrine sur la mobilité de type swimming [Figure 29] qui est dépendante des flagelles (**Henrichsen**, 1972) comme le swarming.

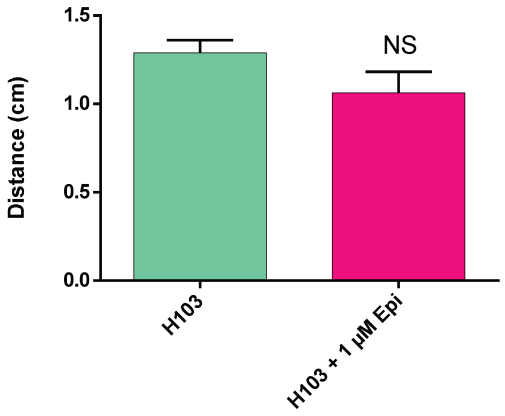


Figure 29. Effet de l'épinéphrine sur le swimming

La barre d'erreur indique la SEM (erreur standard de la moyenne) calculée à partir d'au moins trois expériences indépendantes. Le test-*t* apparié a été utilisé, NS : non significatif.

Les résultats montrent une légère diminution de 0,22 cm mais non significative du swimming. Les flagelles étant impliqués à la fois dans les mobilités de type swimming et swarming, le fait que la mobilité de type swimming ne soit pas modifiée par le traitement à l'épinéphrine laisse supposer que l'augmentation du swarming par cette molécule ne serait pas liée aux flagelles.

2. Sensibilité au phage Pf4

Nous avons vu dans l'article 1, que les pili de type IV semblaient être impliqués dans la réponse à l'épinéphrine. En effet, lorsque *P. aeruginosa* est mis en contact avec le bactériophage PO4, qui se fixe spécifiquement sur les pili de type IV (**Bradley**, 1973), une augmentation du nombre de plages de lyse a été observée en présence d'épinéphrine, montrant que la bactérie était plus sensible au phage PO4 dans cette condition par rapport à la bactérie non traitée avec la molécule. Dans le but de déterminer si l'effet était spécifique ou non à ce phage, nous avons effectué en complément, la même expérience avec un autre bactériophage, le phage Pf4 capable aussi de se fixer sur les pili de type IV (**Castang & Dove**, 2012). Les résultats de ce test sont visibles sur la [Figure 30].

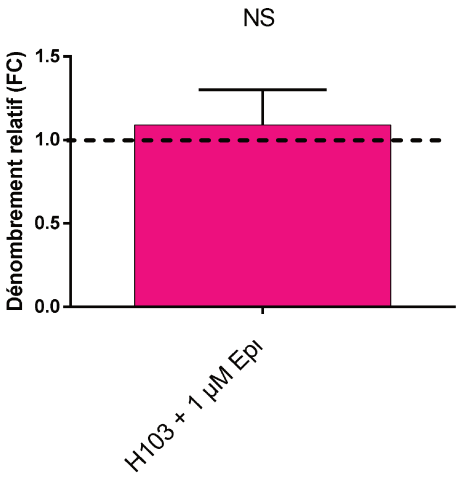


Figure 30. Sensibilité de *P. aeruginosa* H103 au phage Pf4 en présence d'épinéphrine.

Les plages de lyses ont été dénombrées et exprimées en Unité Formant Plage/mL (UFP/mL), les résultats sont présentés en dénombrement relatif rapporté au témoin non traité. La barre d'erreur indique la SEM (erreur standard de la moyenne) calculée à partir d'au moins trois expériences indépendantes. La significativité du résultat a été vérifié par l'utilisation du test-*t* apparié, NS : non significatif.

Les résultats montrent que l'épinéphrine n'augmente pas la sensibilité de *P. aeruginosa* H103 envers le phage Pf4, contrairement aux résultats obtenus précédemment dans l'article, où nous

avons vu que cette sensibilité à l'infection était 3 fois plus importante avec le phage PO4 en présence d'épinéphrine à 1 µM. L'effet observé de l'épinéphrine sur la sensibilité de *P. aeruginosa* H103 aux phages semble donc spécifique au phage PO4. Sachant que *P. aeruginosa* est capable de modifier l'état de glycosylation de ses pili pour se défendre contre les phages (**Harvey et al.**, 2017), la différence de sensibilité envers les deux phages testés pourrait peut-être s'expliquer par un taux de glycosylation plus élevé des pili, qui serait induit par la présence d'épinéphrine.

2. Analyse protéomique

Dans le but d'avoir une vision plus globale des effets de l'épinéphrine, une analyse protéomique par Orbitrap de la souche *P. aeruginosa* H103 a été réalisée, après 6h de culture en milieu LB en présence ou non d'épinéphrine (1 µM). Les protéines ont été réparties selon leurs classes fonctionnelles Pseudocap [Figure 31].

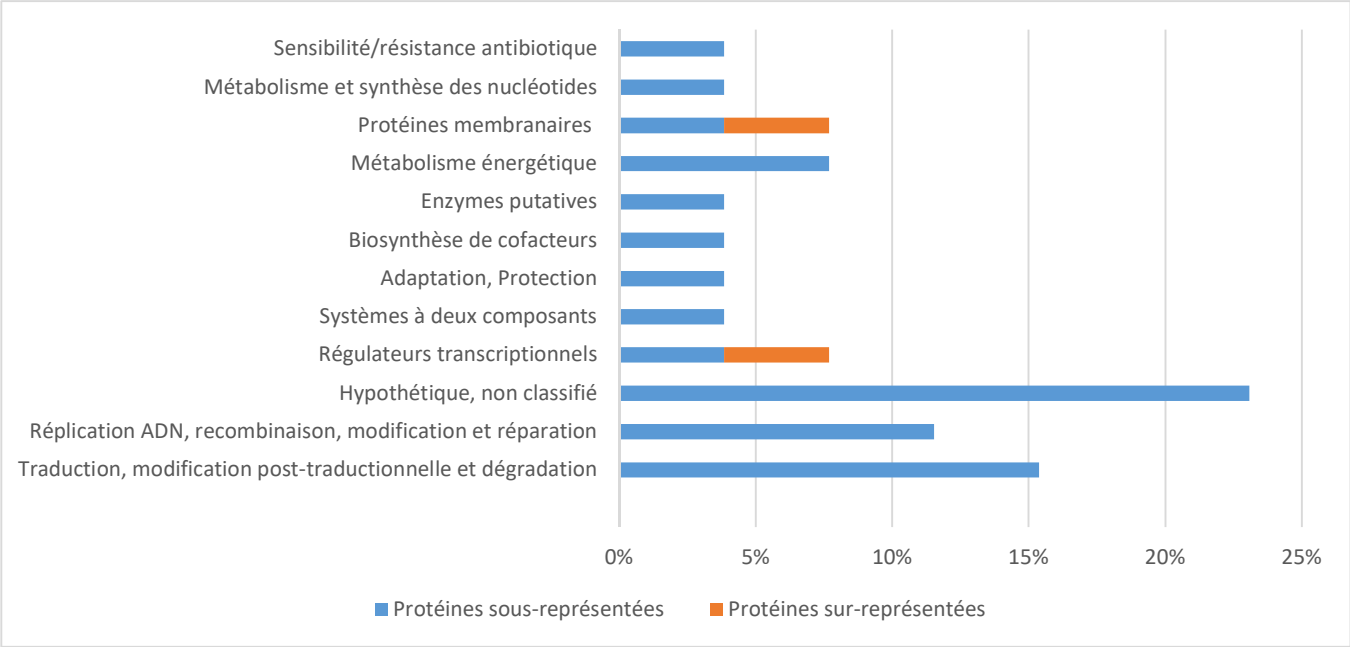


Figure 31. Répartition selon les classes fonctionnelles PseudoCap des protéines différentiellements représentées en condition épinéphrine à 1 µM.

Vingt-six protéines sont différentiellement retrouvées dans la condition épinéphrine à 1 µM. Aucune donnée de la littérature ne permet de comparer ces résultats protéomiques. Les protéines différentiellement représentées, réparties dans 13 classes fonctionnelles Pseudocap, sont impliquées dans la sensibilité aux antibiotiques, le métabolisme des nucléotides mais sont aussi classées comme protéines membranaires ou régulateurs transcriptionnels, une des protéines fait aussi partie d'un TCS. Les résultats montrent que dans nos conditions, deux protéines sont sur-représentées en présence d'1 µM d'épinéphrine [Tableau 14].

Tableau 14. Protéines identifiées à la suite de l'analyse Orbitrap dans la condition épinéphrine (en vert les protéines sur-représentées, en rouge sous-représentées, classées dans l'ordre décroissant).

						Abondance moyenne normalisée	
Code	Nom	Protéine	Fold-changes	PseudoCAP	Anova	Condition E	Condition T
PA5285	SutA		(+) 2,85	Transcriptional regulators / Hypothetical, unclassified, unknown	3,79e-004	1,58e+005	5,54e+004
PA3821	SecD	secretion protein SecD	(+) 2,62	Membrane proteins / Protein secretion/export apparatus	1,04e-006	1,10e+005	4,19e+004
PA5348		probable DNA-binding protein	(-) 2,07	DNA replication, recombination, modification and repair	2,37e-003	1,96e+005	4,06e+005
PA2970	RpmF	50S ribosomal protein L32	(-) 2,09	Translation, post-translational modification, degradation	2,40e-003	2,15e+005	4,49e+005
PA4264	RpsJ	30S ribosomal protein S10	(-) 2,10	Translation, post-translational modification, degradation / Transcription, RNA processing and degradation	4,86e-003	7,72e+005	1,62e+006
PA4053	RibE	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase / riboflavin synthase subunit beta	(-) 2,14	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers	1,31e-004	8,34e+004	1,78e+005
PA5339	RidA	conserved hypothetical protein	(-) 2,18	Hypothetical, unclassified, unknown	1,21e-003	2,10e+005	4,57e+005
PA4271	RplL	50S ribosomal protein L7/L12	(-) 2,27	Translation, post-translational modification, degradation	1,34e-003	1,79e+006	4,06e+006
PA3040	YqjD	conserved hypothetical protein	(-) 2,34	Hypothetical, unclassified, unknown	2,94e-003	2,89e+005	6,77e+005
PA1159		probable cold-shock protein	(-) 2,34	Adaptation, Protection / Transcriptional regulators	2,45e-003	1,54e+005	3,61e+005
PA5240	TrxA	thioredoxin	(-) 2,34	Nucleotide biosynthesis and metabolism / Energy metabolism / Translation, post-translational modification, degradation	4,67e-003	6,86e+004	1,60e+005
PA0537	LemA	conserved hypothetical protein	(-) 2,35	Hypothetical, unclassified, unknown	3,68e-004	5,56e+004	1,30e+005
PA4217	PhzS	flavin-containing monooxygenase	(-) 2,35	Putative enzymes	2,55e-003	1,36e+004	3,19e+004
PA5553	AtpC	ATP synthase epsilon chain	(-) 2,35	Energy metabolism	6,87e-003	6,62e+004	1,55e+005
PA4463	YhbH	conserved hypothetical protein	(-) 2,41	Hypothetical, unclassified, unknown	6,55e-003	1,63e+005	3,93e+005
PA5049	RpmE	50S ribosomal protein L31	(-) 2,65	Translation, post-translational modification, degradation	5,28e-003	2,01e+004	5,33e+004
PA2853	OprI	Outer membrane lipoprotein OprI precursor	(-) 2,69	Membrane proteins	3,13e-003	4,53e+006	1,22e+007
PA5288	GlnK	nitrogen regulatory protein P-II 2	(-) 2,75	Antibiotic resistance and susceptibility / Central intermediary metabolism	2,24e-004	1,82e+005	5,02e+005
PA4944	Hfq		(-) 2,75	Transcription, RNA processing and degradation	1,94e-003	3,32e+004	9,12e+004
PA3435		flavodoxin	(-) 3,04	Hypothetical, unclassified, unknown	9,07e-004	3937,48	1,20e+004
PA5300	CycB	cytochrome C5	(-) 3,26	Energy metabolism	6,78e-004	1,81e+004	5,91e+004
PA3940		probable DNA binding protein	(-) 3,39	DNA replication, recombination, modification and repair	2,07e-003	5,21e+004	1,77e+005
PA0038		hypothetical protein	(-) 3,52	Hypothetical, unclassified, unknown	4,80e-004	2,74e+004	9,65e+004
PA1804	HupB	DNA-binding protein HU	(-) 4,45	DNA replication, recombination, modification and repair	2,19e-004	1,67e+006	7,45e+006
PA0456		probable cold-shock protein	(-) 4,84	Adaptation, Protection / Transcriptional regulators	9,17e-004	1,03e+005	4,96e+005
PA3347	HsbA	hypothetical protein	(-) 9,73	Hypothetical, unclassified, unknown / Two-component regulatory systems / Motility & Attachment	2,25e-003	1,01e+004	9,80e+004

En présence d'épinéphrine, deux protéines sont sur-représentées, il s'agit de SecD, classée dans la fonction Pseudocap « Protéines membranaires » et SutA dans la classe « Régulateurs transcriptionnels ». La protéine SecD est impliquée dans le système de sécrétion Sec qui permet le transport de protéines au niveau périplasmique. Ce système est associé aux systèmes de sécrétion de type II et V, qui permettent de sécréter des lipases ou bien des exotoxines (**Bleves et al.**, 2010). La protéine SutA, a été peu étudiée, cependant selon Babin et al., le gène codant cette protéine serait transcrit lors d'une croissance lente (**Babin et al.**, 2016). Or, l'épinéphrine à 1 µM n'impacte pas la croissance de *P. aeruginosa* en milieu LB. Cette étude a aussi montré que SutA serait importante pour l'établissement d'un biofilm et serait impliquée dans la régulation des phénazines. D'autres protéines ressortent comme étant sous-représentées, comme Hfq qui impacterait le QS de *P. aeruginosa* (**Sonnleitner et al.**, 2006), ou encore HupB, protéine de liaison à l'ADN. Parmi les autres protéines sous-représentées, la quantité de PA3347 est fortement réduite dans la condition épinéphrine (9,73 fois moins de cette protéine). Il s'agit d'un facteur anti-anti-sigma appartenant au phosphorelais HptB (§ I.A.4). Lorsque cette protéine se trouve sous forme non phosphorylée, elle peut piéger l'anti-sigma FlgM qui est normalement associé au facteur sigma FliA, l'empêchant ainsi d'initier la transcription de gènes impliqués dans la mobilité. Elle permet donc sous sa forme non phosphorylée d'activer la transcription des gènes impliqués dans la mobilité qui ne sera plus inhibée par la présence de l'anti-sigma. Au contraire, lorsque HsbA est sous sa forme phosphorylée, elle induit la production de c-di-GMP par l'intermédiaire de la diguanylate cyclase HsbD, amenant indirectement à la formation de biofilm. Pour permettre de mieux comprendre le rôle de HsbA, il serait important de connaître son état de phosphorylation, ce qui permettrait de savoir si la voie se dirige plus vers une activation de la transcription de gènes de mobilité ou au contraire vers un mode de vie sessile.

IV. Discussion

Dans cette première partie nous avons pu montrer que l'épinéphrine était capable d'agir sur différents aspects physiologiques du pathogène *P. aeruginosa*, notamment sur sa capacité d'adhésion, sa formation de biofilm ainsi que sa virulence. En présence de 1 µM d'épinéphrine le swarming de *P. aeruginosa* a été augmenté d'environ 1,2 fois tandis que pour le twitching nous avons observé une différence au niveau de la structure du twitching avec un réseau plus organisé par rapport au témoin non traité. Le swimming n'a pas été affecté par la présence de la molécule. Ces données sont confortées par les résultats précédemment décrits qui ont montré que l'épinéphrine pouvait augmenter le swarming chez *P. fluorescens* après exposition à 1 µM d'épinéphrine (**Biaggini et al.**, 2015) et le twitching d'un isolat clinique de *P. aeruginosa* à 5 µM mais dont le swimming n'était pas modifié à cette même concentration d'épinéphrine (**Freestone et al.**, 2012). Le twitching ainsi que la sensibilité aux phages, impliquent les pili de type IV, la réponse à ces deux phénotypes pourrait donc être liée à ce composant bactérien. Les deux phages utilisés, PO4 et Pf4, se fixent sur les pili de type IV pour infecter la bactérie (**Bradley**, 1973; **Castang & Dove**, 2012), or un traitement à l'épinéphrine semble rendre la bactérie plus sensible seulement au phage PO4. Les mécanismes exacts par lesquels ces deux types de bactériophages fixent les pili sont encore mal connus. Cependant, une étude réalisée en 2017, a démontré qu'une glycosylation de la piline majoritaire (PilA) empêcherait la fixation de phages ayant pour cible les pili de type IV, ce qui montrerait que les phages infectant la bactérie par les pili de type IV, se fixeraient sur PilA (**Harvey et al.**, 2017). De plus, Secor *et al*., avaient déjà émis l'hypothèse que le phage Pf4 pourrait se fixer sur PilA (**Secor et al.**, 2017). Nos résultats laissent donc suggérer que l'épinéphrine pourrait impacter l'état de glycosylation des pili, ce qui affecterait ainsi la sensibilité de la bactérie à certains bactériophages. Par ailleurs, nous avons montré aussi dans notre étude que la production des rhamnolipides, impliqués dans la mobilité de type swarming n'est pas modifiée en présence d'épinéphrine. Au contraire, cette molécule stimule l'adhésion de *P. aeruginosa* H103 sur des surfaces abiotiques et une concentration d'épinéphrine à 10 µM entraine la formation d'agrégats. En 2003, Lyte *et al*., ont aussi montré que l'adhésion de

S. epidermidis sur des surfaces en polystyrène était induite en présence de dopamine et de norépinéphrine et les auteurs ont également observé la présence d'agrégats qui pourrait s'expliquer par une augmentation de la production d'EPS (**Lyte et al.**, 2003). Ces agrégats cellulaires ont aussi été mis en évidence chez *P. aeruginosa* PA14, dans un milieu SAPI supplémenté en épinéphrine (5 µM) (**Freestone et al.**, 2012).

Les biofilms fournissent notamment aux bactéries une protection contre les peptides antimicrobiens et le système immunitaire de l'hôte. De plus, la pathogénicité des bactéries est souvent liée à la formation de biofilm. L'étude du biofilm dans des conditions dynamiques (flow-cell) a permis de montrer que l'épinéphrine à une concentration de 10 µM augmente le biovolume ainsi que l'épaisseur maximale des biofilms de *P. aeruginosa* H103 de respectivement 57% et 29%. Chez d'autres bactéries telles qu'*E. coli*, *S. epidermidis, S. pneumoniae* ou encore *V. harveyi*, cet effet stimulant des catecholamines sur le biofilm a également été mis en évidence (**Bansal et al.**, 2007; **Lyte et al.**, 2003; **Sandrini et al.**, 2014; **Yang et al.**, 2014). Le mécanisme par lequel l'épinéphrine agit sur le biofilm reste encore inconnu. On peut cependant émettre l'hypothèse que l'impact de l'épinéphrine sur les pili de type IV pourrait contribuer à la stimulation de l'adhésion, première étape de la formation du biofilm. En effet, le pili de type IV est connu pour son rôle dans l'adhésion bactérienne à travers la mobilité de type twitching mais également dans le développement des microcolonies et la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* (**Craig et al.**, 2004; **Jenkins et al.**, 2005; **Klausen et al.**, 2003; **O'Toole & Kolter**, 1998). Au vu des effets observés sur la formation de biofilm, nous nous sommes intéressés par la suite à l'impact que pouvait avoir l'épinéphrine sur la virulence de *P. aeruginosa*. Nous avons pu montrer qu'une concentration de 10 µM d'épinéphrine stimule la virulence de *P. aeruginosa* envers le modèle *Galleria mellonella*. En effet, 13h après l'injection avec la bactérie traitée à l'épinéphrine, le taux de survie de *G. mellonella* était de 31%, tandis que pour l'injection avec la souche non traitée à l'épinéphrine, le taux de survie était de 58%. Nos résultats sont en accord avec d'autres études qui ont montré également que les catécholamines pouvaient augmenter la virulence de bactéries pathogènes comme *V. harveyi* chez un modèle de larve d'artémie (taux de survie de 27% avec la bactérie prétraitée avec la norépinéphrine contre 50% pour la bactérie non

traitée) (**Yang et al.**, 2014) ou encore *V. campbellii* BB120 envers le modèle de larve de crevette (taux de survie de 33% contre 50% pour la bactérie non traitée) (**Pande et al.**, 2014).

Les résultats de protéomique suggèrent que la protéine HsbA pourrait jouer un rôle dans la réponse de *P. aeruginosa* exposée à l'épinéphrine. Le peu de protéines différentiellement retrouvées lors de cette analyse laisse penser que les conditions dans lesquelles ont été réalisées l'extraction protéique n'étaient peut-être pas optimales pour observer une variation liée au traitement à l'épinéphrine.

L'étude réalisée au cours de ce premier chapitre a permis de montrer que l'épinéphrine était capable d'affecter la physiologie de *P. aeruginosa* en milieu riche (LB). Cependant, les effets des catécholamines semblent être dépendants des milieux de cultures utilisés, c'est pourquoi certains travaux de recherche décrits dans la littérature utilisent un milieu spécifique supplémenté en sérum qui mimerait des conditions plus proches de celles retrouvées *in vivo*. Nous avons donc décidé d'explorer aussi cet aspect pour étudier l'effet de l'épinéphrine chez *P. aeruginosa*. Les résultats de ces travaux sont exposés dans le chapitre 2 qui suit.

Chapitre II : Effet de l'épinéphrine sur *Pseudomonas aeruginosa* H103 en milieu minimum sérum-SAPI

I. Introduction

Nous avons vu précédemment que *P. aeruginosa* était capable de ressentir l'épinéphrine et de modifier certains de ses caractères physiologiques en présence de cette molécule, tels que ses mobilités de type swarming et twitching ou encore sa capacité à adhérer à des surfaces. Nous avons également montré que l'épinéphrine était capable de stimuler la formation de biofilm chez cette bactérie. Comme décrit dans l'introduction bibliographique (§I.A.5), le fer est un élément indispensable à la croissance bactérienne. Les environnements pauvres en fer représentent donc un frein à la multiplication bactérienne et à la mise en place de leur virulence. Chez de nombreux hôtes, et notamment chez l'Homme, il existe des protéines du système immunitaire qui permettent de séquestrer le fer et le rendre indisponible pour d'éventuelles bactéries pathogènes. De nombreuses études (**Burton et al.**, 2002; **Kinney et al.**, 1999; **Lyte & Ernst**, 1991) portant sur l'effet des catécholamines chez certaines espèces bactériennes se sont donc placées dans des conditions mimant cet environnement carencé en fer par l'utilisation du milieu minimum SAPI, supplémenté en sérum (sérum-SAPI). Ce milieu contient des transferrines, protéines qui permettent de fixer le fer et de le rendre non accessible pour les bactéries. Les catécholamines, quant à elles, ont la capacité d'augmenter la biodisponibilité du fer dans le milieu. En effet, une étude a montré que l'épinéphrine, la norépinéphrine ainsi que la dopamine pouvaient former un complexe avec le fer ferrique Fe^{3+} présent dans ces transferrines (**Sandrini et al.**, 2010), le rendant accessible aux bactéries par un mécanisme encore inconnu. L'utilisation de ce milieu sérum-SAPI, supplémenté en norépinéphrine, a permis de mettre en évidence la stimulation de la croissance de bactéries comme *E. coli* (**Lyte & Ernst**, 1991) ou *S. enterica* (**Freestone et al.**, 2007). Chez *P. aeruginosa* PAO1, une diminution de la production de pyoverdine a aussi été montré en milieu sérum-SAPI en présence de norépinéphrine (**Li et al.**, 2009). En revanche, aucune étude n'a concerné jusqu'à présent, l'effet de l'épinéphrine sur *P. aeruginosa* dans ces conditions expérimentales. Dans ce contexte, nous avons donc choisi de compléter nos travaux sur *P. aeruginosa* par une étude en milieu sérum-SAPI. La première étape du travail a été d'observer l'effet de différentes concentrations d'épinéphrine sur la croissance de *P. aeruginosa* en milieu sérum-SAPI, puis d'examiner les réponses physiologiques et génétiques associées.

II. Résultats

1. Effets de l'épinéphrine sur la croissance de *P. aeruginosa* H103

Un suivi de croissance de *P. aeruginosa* H103 a été réalisé en présence de différentes concentrations en épinéphrine, de 1 à 100 µM. Les résultats de ces croissances sont visibles sur la [Figure 32].

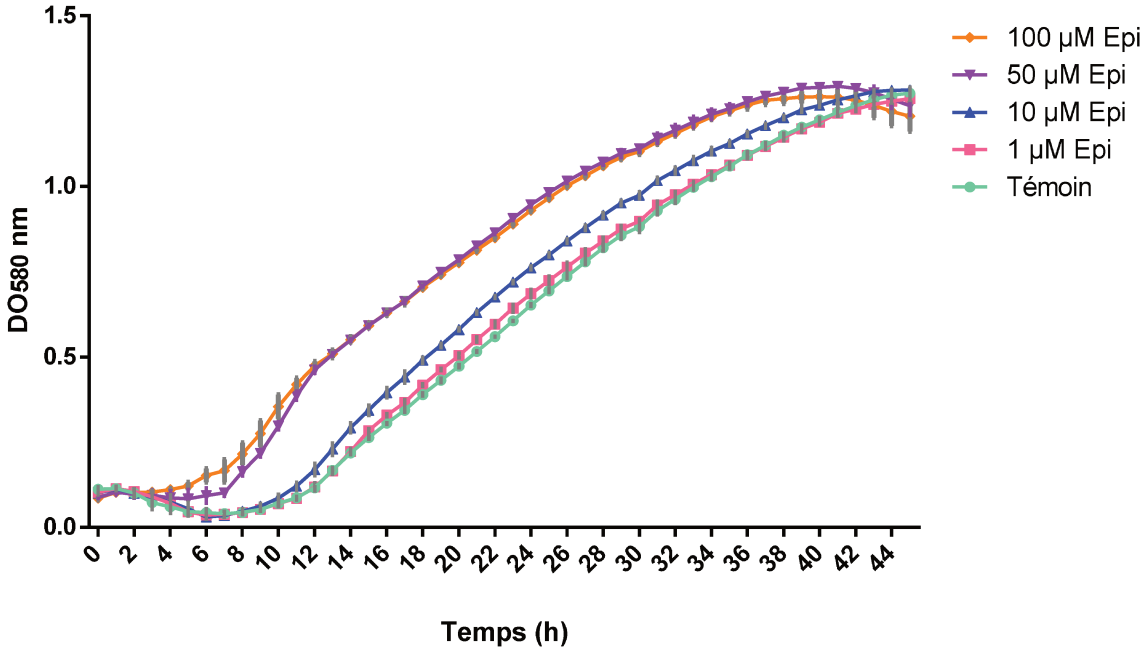


Figure 32. Courbes de croissance de *P. aeruginosa* H103 en milieu sérum-SAPI, supplémenté ou non avec de l'épinéphrine (1 à 100 µM).

Les résultats obtenus montrent qu'en milieu sérum-SAPI, supplémenté en épinéphrine, la croissance de *P. aeruginosa* H103 est stimulée de manière dose-dépendante. En effet, la concentration de 1 µM en épinéphrine ne semble pas affecter la croissance de la bactérie. Au contraire, les concentrations de 10, 50 et 100 µM en épinéphrine stimulent nettement sa croissance. Une diminution du temps de latence est aussi observée, notamment en présence de 50 et 100 µM avec une phase de latence de 5h contre 10h dans la condition témoin (sans épinéphrine). Ce temps de latence, particulièrement long dans le milieu sérum-SAPI pourrait s'expliquer par le fait que celui-ci est carencé en fer, et nécessite donc le temps que la bactérie

mette en place son système d'acquisition de fer par la production de sidérophores. Pour la suite de notre étude, nous avons choisi de ne garder que les concentrations de 1 et 50 µM en épinéphrine, qui correspondent respectivement, à la concentration précédemment étudiée en milieu LB, et à la concentration minimale permettant une stimulation maximale de la croissance.

2. Effets de l'épinéphrine sur la production de pyoverdine

Les résultats de la littérature suggèrent que la stimulation de la croissance bactérienne, observée en présence de catécholamines, pourrait être en partie liée à une augmentation de la biodisponibilité du fer pour la bactérie (**Bearson et al.**, 2008; **Freestone et al.**, 2000). Nous avons donc décidé d'étudier l'effet de l'épinéphrine sur la production d'un des sidérophores majoritaires de *P. aeruginosa* H103, la pyoverdine. Pour cela, une cinétique de production de ce sidérophore a été réalisée en milieu minimum sérum-SAPI, supplémenté ou non avec de l'épinéphrine (1 et 50 µM). La production de pyoverdine a été estimée par un dosage d'absorbance à 405 nm et normalisée à la croissance bactérienne mesurée à la DO_{580} [Figure 33].

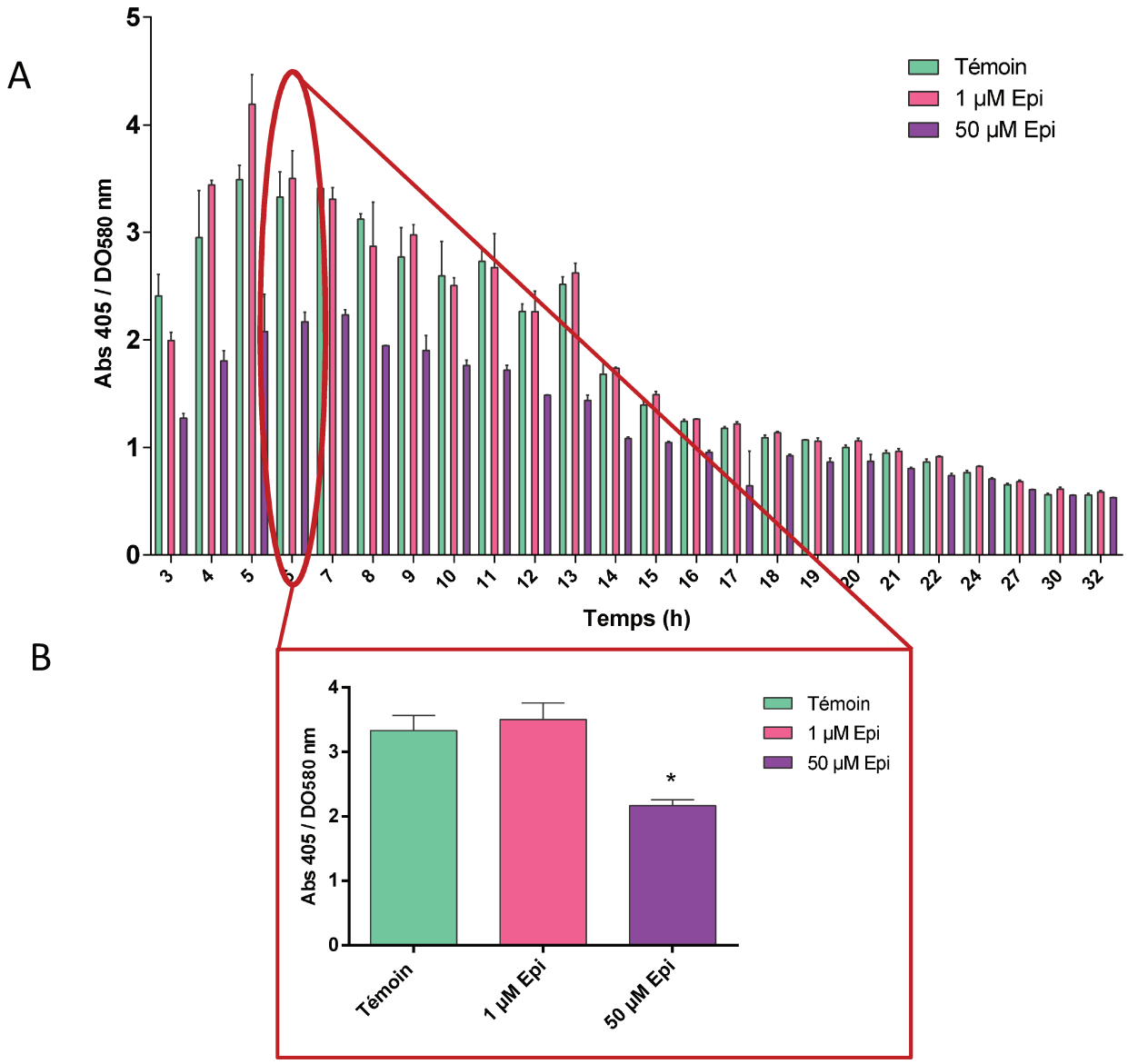


Figure 33. Effet de l'épinéphrine sur la production de pyoverdine

(A) Cinétique de production de pyoverdine chez *P. aeruginosa* H103 en milieu sérum-SAPI, supplémenté ou non avec 1 ou 50 µM d'épinéphrine, (B) Dosage de la pyoverdine au temps 6h. La barre d'erreur indique la SEM (erreur standard de la moyenne) calculée à partir d'au moins trois expériences indépendantes. Le test-*t* a été utilisé, * *p*-value <0,05.

Ces résultats montrent qu'en milieu sérum-SAPI carencé en fer, et en présence d'une concentration de 1 µM en épinéphrine, la quantité de pyoverdine produite par *P. aeruginosa* H103, est similaire au témoin. Au contraire, à une concentration de 50 µM en épinéphrine, la production de pyoverdine par *P. aeruginosa* H103, est nettement diminuée dès les premières heures de croissance, comparée à la production chez la bactérie non traitée, et ce jusqu'à environ 17h de culture. L'écart de production de pyoverdine semble être le plus important après 3h de culture, avec une diminution de 47% de la production. A 6h de culture, cet écart de production entre bactérie traitée et non traitée avec 50 µM en épinéphrine reste encore très significatif de l'ordre de 35% [Figure 33A et 33B].

Ces expériences montrent qu'avec une concentration élevée en épinéphrine (50 µM), la bactérie n'a pas besoin de produire son propre sidérophore pour capter le fer nécessaire à sa croissance. Ceci peut permettre d'expliquer que le temps de latence, précédemment déterminé dans la cinétique de croissance en milieu sérum-SAPI pauvre en fer, était très réduit en présence de 50 µM en épinéphrine [Figure 32].

3. Analyses transcriptomiques des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer

Une analyse transcriptomique des gènes *pvdH* et *pvdS,* codant deux protéines impliquées dans la production de pyoverdine chez *P. aeruginosa* H103*,* du gène *fur* codant le régulateur du fer, ainsi que des gènes *pfeA, pirA, fptA, fpvA, fpvB* et *feoB*, liés au transport du fer, a été réalisée à partir de cultures (de 24h) en milieu sérum-SAPI. Les résultats sont présentés sur la [Figure 34].

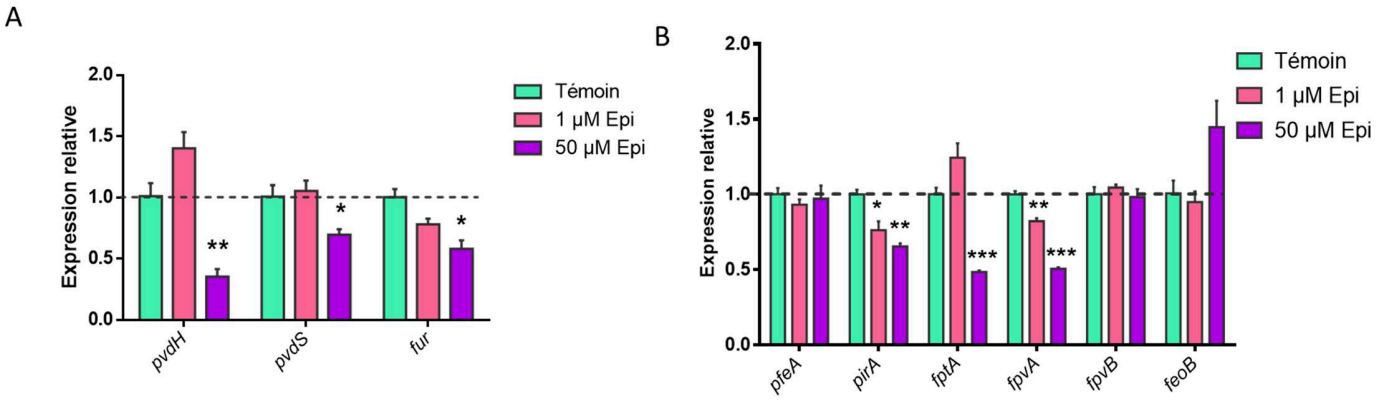


Figure 34. Analyse de l'expression des gènes impliqués dans les systèmes d'acquisition du fer

(A) Expression relative des gènes *pvdH*, *pvdS* et *fur,* (B) Expression relative des gènes *pfeA, pirA, fptA, fpvA, fpvB* et *feoB,* liés au transport du fer. La barre d'erreur indique la SEM (erreur standard de la moyenne) calculée à partir d'au moins trois expériences indépendantes. Le test-*t* a été utilisé, * *p*-value <0,05, ** *p*-value <0,01, *** *p*-value <0,001.

Les résultats de l'analyse transcriptomique en milieu sérum-SAPI montre que le niveau d'expression des ARNm de *pvdH,* impliqué dans la synthèse de pyoverdine et de *pvdS,* codant le facteur sigma, est réduit de façon significative, en présence de 50 µM d'épinéphrine, respectivement de 65% et 30%. De même, l'expression du gène *fur*, régulateur du fer, est aussi diminuée significativement de 40%, en présence de 50 µM d'épinéphrine [Figure 34A].

D'autres gènes, impliqués dans le transport du fer chez *P. aeruginosa* H103, ont été testés : *pfeA* et *pirA* (codant les transporteurs de ferrientérobactine), *fptA* (codant le transporteur de la ferripyochéline), *fpvA* et *fpvB* (codant les transporteurs de la ferripyoverdine), et *feoB* (codant le transporteur du fer sous sa forme Fe^{2+}) [Figure 34B]. Les résultats montrent que les taux d'ARNm de *pfeA* et *fpvB* ne sont pas modifiés en milieu sérum-SAPI en présence d'épinéphrine (1 ou 50 µM). Une hausse de 44% du taux de transcrit de *feoB* est observée en présence de 50 µM d'épinéphrine, mais celle-ci n'est pas significative. Enfin, pour *pirA, fpvA* et *fptA*, les taux d'ARNm sont diminués de façon significative, en présence de 50 µM d'épinéphrine, respectivement de 35%, 50% et 52%.

L'ensemble de ces résultats montrent donc que, lorsque *P. aeruginosa* H103 est exposée à une concentration de 50 µM en épinéphrine sa production de pyoverdine et plus généralement, l'expression des gènes liés à l'homéostasie du fer est significativement réduite.

Afin de comprendre le rôle des systèmes d'acquisition du fer dans la réponse de *P. aeruginosa* PAO1 H103 exposée à l'épinéphrine, nous avons voulu observer le comportement de mutants ne produisant plus de sidérophores dans le milieu sérum-SAPI supplémenté en épinéphrine. Pour cela, des mutants de *P. aeruginosa* PAO1 ne produisant ni pyoverdine ni pyocheline (PAO1Δ*pvdDpchEF*) ainsi que des souches mutées sur les transporteurs FpvA et FpvB (PAO1Δ*pvdDpchEF* Δ*fpvA ;* PAO1Δ*pvdDpchEF* Δ*fpvB ;* PAO1Δ*pvdDpchEF* Δ*fpvAB*) obtenus lors de l'étude de Ghysels et al., (**Ghysels et al.**, 2004) nous ont été fournis par le Dr Aurélie Crabbé (Laboratory of Pharmaceutical Microbiology, LPM, Université de Gent). Ces mutants ont été testés en milieu sérum-SAPI, supplémenté ou non en épinéphrine (50 µM) et leurs croissances dans ce milieu ont été étudiées.

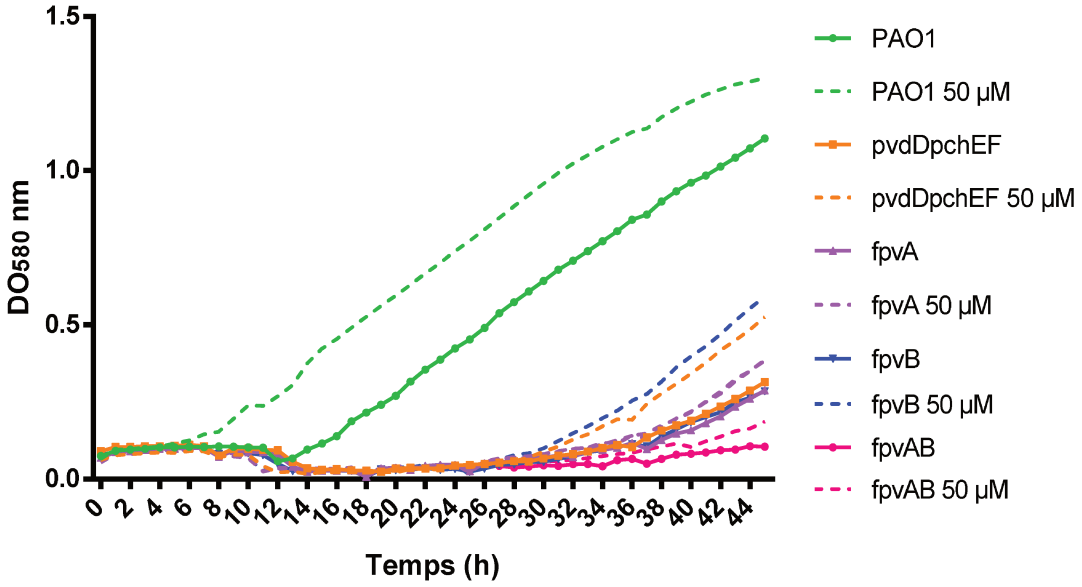


Figure 35. Effet de l'épinéphrine (50 µM) sur la croissance des mutants de *P. aeruginosa* PAO1 déficients en sidérophores et transporteurs associés

Les cinétiques de croissance ont été réalisées à 37°C pendant 45h, en milieu sérum-SAPI, supplémenté ou non avec 50 µM d'épinéphrine. Les courbes en pointillés correspondent aux croissances en milieu sérum-SAPI, supplémenté avec 50 µM d'épinéphrine, et les traits pleins aux croissances en milieu sérum-SAPI sans ajout d'épinéphrine.

Les résultats de la [Figure 35] montrent, comme vu précédemment, que la croissance de *P. aeruginosa* PAO1 en milieu sérum-SAPI présente une phase de latence d'environ 10h. Tous les mutants de *P. aeruginosa* PAO1 étudiés montrent, quant à eux, un retard important de croissance avec une phase de latence d'environ 36h, sauf le mutant *ΔpvdDpchEFfpvAB* qui s'est avéré en incapacité complète de se développer dans le milieu sérum-SAPI.

Lorsque le milieu est supplémenté en épinéphrine à 50 µM, une stimulation de la croissance est observée pour la souche sauvage PAO1, ainsi que pour les mutants Δ*pvdDpchEF* et *ΔpvdDpchEFfpvB.* En effet, pour ces 2 derniers, le temps de latence est ramené à environ 30h en présence de 50 µM d'épinéphrine. Le mutant *ΔpvdDpchEFfpvA,* qui était quant à lui très déficient au niveau de la croissance, ne semble pas du tout pouvoir se développer, malgré la présence d'épinéphrine. Un suivi de croissance a également été réalisé avec une plus faible concentration en épinéphrine (1 µM). Dans ces conditions, l'épinéphrine n'a pas permis de stimuler la croissance des mutants testés (résultats non montrés).

4. Effet de l'épinéphrine sur la production de pyocyanine et implication du QS

Au vu des résultats obtenus avec la pyoverdine, il nous a semblé intéressant d'évaluer aussi l'effet de l'épinéphrine sur la production de pyocyanine, composé capable de réduire le fer Fe^{3+} (**Wang & Newman**, 2008). Après 24h de culture de *P. aeruginosa* H103 en milieu sérum-SAPI, en présence d'épinéphrine (1 et 50 µM), la pyocyanine a été extraite puis dosée à 520 nm. La quantité de pyocyanine produite a ensuite été normalisée sur la DO_{580}. Une analyse de l'expression des gènes *phzS* et *phzM*, impliqués dans la voie des phénazines et responsables de la synthèse de pyocyanine a aussi été effectuée. Enfin, le QS de *P. aeruginosa* pouvant intervenir dans la production de pyocyanine par l'intermédiaire du PQS, l'expression des gènes *pqsA*, *pqsE* et *pqsR* a également été étudiée par RTq-PCR, après 24h de culture en milieu sérum-SAPI. Les résultats sont présentés sur la [Figure 36].

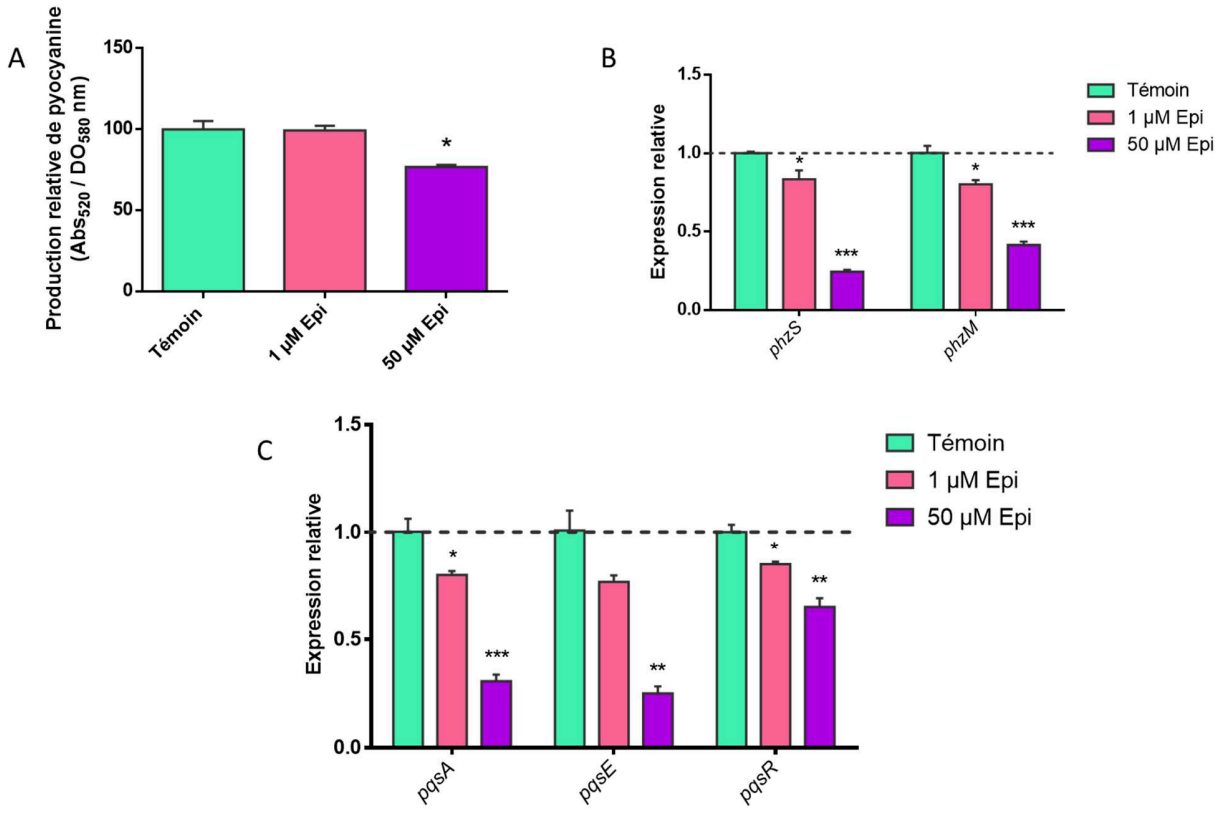


Figure 36. Effet de l'épinéphrine sur la production de pyocyanine par *P. aeruginosa* H103, après 24h de culture en milieu sérum-SAPI, supplémenté ou non avec 1 ou 50 µM d'épinéphrine.

(A) Dosage de la pyocyanine, normalisée par rapport au témoin non traité, (B) Expression relative des gènes *phzS* et *phzM,* (C) Expression relative des gènes *pqsA pqsE* et *pqsR.* La barre d'erreur indique la SEM (erreur standard de la moyenne) calculée à partir d'au moins trois expériences indépendantes. Le test-*t* a été utilisé, * *p*-value <0,05, ** *p*-value <0,01, *** *p*-value 0,001.

L'analyse de ces résultats montrent que lorsque la bactérie est cultivée en milieu sérum-SAPI en présence d'épinéphrine à 1 µM, la production de pyocyanine n'est pas impactée, tandis que le niveau d'expression des gènes *phzS, phzM*, *pqsA*, *pqsE* et *pqsR* est légèrement diminué. En présence d'une dose 50 fois plus élevée en épinéphrine (50 µM), la production de pyocyanine chez *P. aeruginosa* est réduite de 23% [Figure 36A], et le niveau d'expression de *phzS* et *phzM*, impliqués dans la voie des phénazines, et responsables de la synthèse de pyocyanine, est diminué respectivement de 76% et 59% [Figure 36B]. Enfin toujours pour cette dose d'épinéphrine,

l'expression des gènes impliqués dans la voie PQS, est également réduite de 70% pour *pqsA*, 75% pour *pqsE*, et 35% pour *pqsR* [Figure 36C].

5. Etude de la virulence sur le modèle *C. elegans*

Le fer et le PQS étant impliqués dans la virulence bactérienne, nous avons poursuivi notre étude par une évaluation de la virulence de *P. aeruginosa*, cultivée en milieu sérum-SAPI en présence ou non d'épinéphrine à 1 ou 50 µM, sur le modèle *C. elegans.* Pour ce faire, la virulence de *P. aeruginosa* a été évaluée par utilisation du test « fast-killing ». Les vers ont été dénombrés jusqu'à 24h après l'infection [Figure 37].

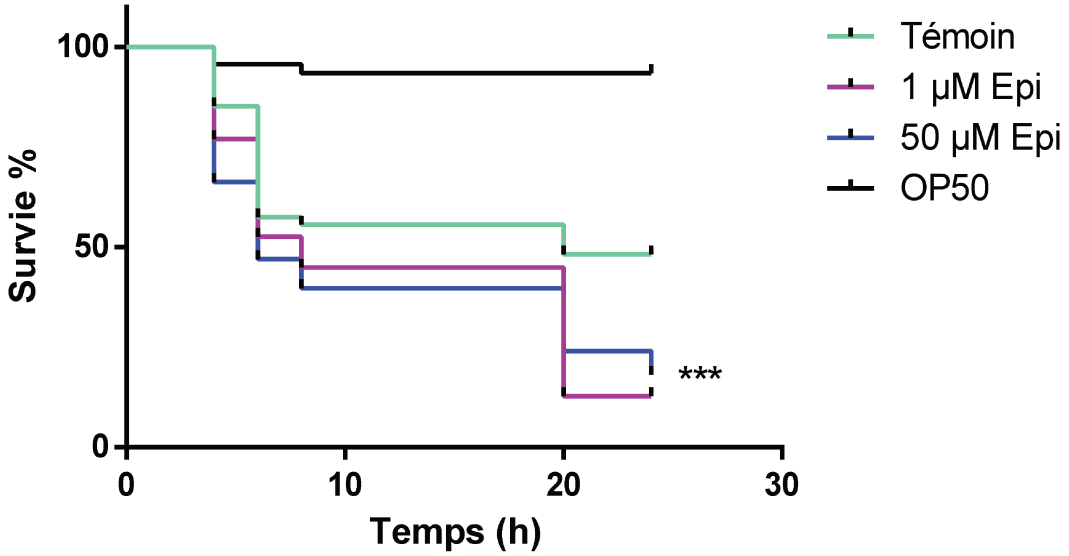


Figure 37. Courbes de survie de *C. elegans* après infection avec *P. aeruginosa* H103 traitée ou non avec l'épinéphrine (1 et 50 µM).

Le Log-rank (Mantel-Cox) test a été utilisé (*** *p*-value 0,0006).

Après 4h de contact avec *P. aeruginosa* H103, traitée ou non à l'épinéphrine (1 et 50 µM), la survie des nématodes est respectivement de 76% et 66% [Figure 38] comparée au contrôle. Après 24h,

seulement 13% des nématodes infectés avec *P. aeruginosa* H103, traitée avec 1 µM d'épinéphrine sont encore en vie, et 18% en présence d'épinéphrine à 50 µM, alors que 50% des vers infectés avec *P. aeruginosa* H103 non traitée à l'épinéphrine sont encore en vie. Le contrôle avec *E. coli* OP50 permet de vérifier la survie naturelle du ver lors de l'expérience.

III. Discussion

Chez les bactéries, et notamment chez de nombreux pathogènes, le fer est un élément essentiel impliqué dans la croissance bactérienne, la composition cellulaire, mais intervient aussi dans le métabolisme intermédiaire ainsi que dans certaines réactions enzymatiques (**Messenger & Barclay**, 1983; **Ratledge & Dover**, 2000). Des protéines comme la transferrine ou lactoferrine, présentes chez l'Homme, permettent de séquestrer le fer et constituent une première ligne de défense contre ces microorganismes (**Johnson & Wessling-Resnick**, 2012). L'utilisation d'un milieu « serum-like », dans lequel transferrine et lactoferrine séquestrent le fer, a permis de mimer au mieux ce qui peut survenir lors d'une infection au sein de l'hôte (**Lyte**, 2004). Ce milieu appelé sérum-SAPI, a mis en évidence les effets stimulants des catécholamines sur la croissance bactérienne. Dans notre étude, la croissance de *P. aeruginosa* H103 était augmentée en présence d'épinéphrine à partir d'une concentration de 10 µM, mais c'est à 50 et 100 µM que les effets étaient les plus importants. D'autres études ont montré une stimulation de la croissance chez des bactéries à Gram négatif comme *E. coli* (**Lyte & Ernst**, 1991), ou encore *P. aeruginosa* PAO1 avec une concentration en catécholamines de 50 et 500 µM (**Hegde et al.**, 2009; **Li et al.**, 2009). Cette augmentation de la croissance est due, notamment, à la capacité qu'ont les catecholamines à capter le fer, initialement fixé aux transferrines/lactoferrines, et à former un complexe avec celui-ci (**Sandrini et al.**, 2010), rendant ainsi disponible le fer pour la bactérie, même si à ce jour le mécanisme exact par lequel la bactérie internalise le fer reste inconnu.

Pour récupérer le fer dans le milieu extracellulaire, les bactéries produisent des sidérophores. La pyoverdine est un sidérophore produit par *P. aeruginosa* qui possède une forte affinité pour le fer (**Cornelis & Dingemans**, 2013). Au cours de ces travaux, nous avons pu montrer qu'en présence de 50 µM d'épinéphrine, la production de pyoverdine est diminuée ainsi que l'expression du gène *pvdH*, codant une protéine impliquée dans la biosynthèse de la pyoverdine. L'expression de *pvdS* codant pour le facteur sigma PvdS, régulateur de la synthèse de pyoverdine, était également réduite. De façon similaire, Hegde et al., ont montré que dans un milieu RPMI, en présence de norépinéphrine à 50 µM, l'expression des gènes de biosynthèse de la pyoverdine était également diminuée chez *P. aeruginosa* PA14, de même que l'expression du gène codant le

facteur sigma PvdS avec un « fold change » de -7,5 (**Hegde et al.**, 2009). Ces mêmes effets ont aussi été observés chez *P. aeruginosa* PAO1 en présence de norépinéphrine à 50 µM (**Li et al.**, 2009). L'épinéphrine serait donc capable de fournir du fer à la bactérie et entraine une diminution de son sidérophore principal par l'intermédiaire de PvdS. Dans l'environnement, le fer est présent sous la forme Fe^{3+}, les bactéries peuvent le réduire en Fe^{2+} par l'intermédiaire de métabolites comme la pyocyanine (**Wang & Newman**, 2008) notamment synthétisée par la voie des phénazines (**Mavrodi et al.**, 2001). Dans notre étude, nous avons pu montrer qu'à 50 µM d'épinéphrine, l'expression des gènes *phzS* et *phzM,* codant deux enzymes nécessaires pour la synthèse de pyocyanine, était diminuée ainsi que la quantité de pyocyanine. Les mêmes résultats ont été obtenus en présence de norépinéphrine à 50 µM pour la souche *P. aeruginosa* PA14 (**Hegde et al.**, 2009). Les phénazines sont en partie régulées par le PQS (**Déziel et al.**, 2004), un des systèmes du QS de *P. aeruginosa*, dont les gènes *pqsA* et *pqsE* sont tous deux sous-exprimés dans nos conditions sérum-SAPI supplémenté en épinéphrine. L'opéron *pqsABCDE* est sous le contrôle de PqsR, qui est lui-même régulé par PvdS (**Ochsner et al.**, 2002), LasR et RhlR (**Wade et al.**, 2005). Cette diminution de la production de pyocyanine peut s'expliquer par la présence d'épinéphrine qui va, une fois complexée au fer Fe^{3+}, le réduire en Fe^{2+} (**Sandrini et al.**, 2010). Dans ces conditions, en présence de molécules capable de réduire le fer, il n'est pas nécessaire pour la bactérie de produire de métabolites telles que la pyocyanine (**Wilson et al.**, 1988). La diminution de la transcription des gènes liés au transport du fer, *fptA* et *fpvA*, observée dans notre étude, a aussi été mise en évidence par Hegde et al., en présence de 50 µM de norépinéphrine (**Hegde et al.**, 2009). Au contraire, dans cette étude, les auteurs ont montré une diminution de l'expression de *fpvB*, un deuxième transporteur de ferripyoverdine, qui n'est pas impacté par l'épinéphrine dans nos conditions. Le gène *fpvA*, régulé par FpvI sous la dépendance de Fur, possède un taux de transcrit réduit en présence d'épinéphrine. Quant aux autres transporteurs de ferrientérobactines codés par les gènes *pirA* et *pfeA*, ils sont tous deux sous-exprimés en présence d'épinéphrine. La diminution de l'expression de gènes codant pour des transporteurs de fer, pourrait indiquer un niveau de fer intracellulaire suffisant pour la bactérie et ne nécessitant pas la mise en place de système d'import. L'homéostasie du fer est contrôlée par le régulateur Fur. En présence d'une concentration intracellulaire suffisante en fer, Fur complexé au fer inhibe

la transcription de gènes tels que *pvdS*, *fpvI* ou *fpvB* ou *pfeA,* (**Cornelis et al.**, 2009) en se fixant au niveau de régions promotrices sur des séquences appelées Fur-box. Les diminutions observées concernant l'expression de gènes, codant les transporteurs de fer, nous ont amené à étudier des mutants déficients en sidérophores et/ou transporteurs. Parmi les mutants testés, seul le mutant Δ*pvdDpchEFfpvA* semble ne pas répondre à la présence d'épinéphrine lors de sa croissance en milieu sérum-SAPI. Ce mutant étant incapable de produire des sidérophores et ne possédant plus le récepteur FpvA ne pourrait pas internaliser le fer par l'intermédiaire de l'épinéphrine comme cela semble être le cas chez la souche sauvage PAO1, ainsi que chez le mutant déficient en pyoverdine et pyocyanine. La stimulation de la croissance de *P. aeruginosa* exposée à l'épinéphrine pourrait donc être, en partie, médiée par le récepteur FpvA.

Au vu de l'implication du fer dans la virulence bactérienne et de l'effet de l'épinéphrine sur certains gènes du système PQS, nous avons examiné la virulence sur le nématode *Caenorhabditis elegans,* par le test du « fast-killing » qui s'effectue en quelques heures sur milieu gélosé. Cette étude a permis de montrer que *P. aeruginosa* présentait une virulence accrue en présence d'épinéphrine. D'autres travaux ont également mis en évidence la stimulation de la virulence bactérienne par les catécholamines (**Pande et al.**, 2014; **Torabi Delshad et al.**, 2019; **Yang et al.**, 2014). La mortalité de *C. elegans,* dans ces conditions, serait médiée par un relargage de toxines diffusibles de la part de *P. aeruginosa.* Parmi ces toxines, les phénazines seraient en partie responsables de la mortalité du nématode (**Mahajan-Miklos et al.**, 1999). La synthèse des phénazines fait intervenir un nombre important de gènes répartis sur deux opérons *phzA-G1* et *phzA-G2* permettant la synthèse de l'acide phénazique-1-carboxylique (PCA) et de gènes impliqués dans la conversion de la PCA en pyocyanine (*phzS*, *phzM)*, en phénazine-1-carboxamide (*phzH*) et en 1-hydroxyphénazine (*phzS*) (**Mavrodi et al.**, 2001; **Nadal Jimenez et al.**, 2012). Dans l'étude menée par Cezairliyan et al., parmi les phénazines synthétisées par *P. aeruginosa*, l'acide phénazique-1-carboxylique semblait être la première responsable de la mortalité de *C. elegans* (**Cezairliyan et al.**, 2013).

Dans cette deuxième partie, consacrée à l'étude de la réponse de *P. aeruginosa* exposée à l'épinéphrine, nous avons pu montrer qu'en utilisant un milieu mimant les conditions *in vivo* (milieu minimum sérum-SAPI), l'épinéphrine stimulait la croissance de *P. aeruginosa* H103. Cette

catécholamine est capable de se complexer au fer, initialement contenu dans des protéines eucaryotes comme la transferrine ou la lactoferrine, le rendant ainsi biodisponible pour la bactérie en le réduisant en Fe^{2+}. Ainsi, il n'est plus nécessaire pour la bactérie de synthétiser et mettre en place ses propres systèmes d'acquisition du fer puisque l'épinéphrine pourrait jouer le rôle de xénosidérophore. La présence d'épinéphrine semble également augmenter la virulence bactérienne de *P. aeruginosa*. Les hormones de stress épinéphrine/norépinéphrine, sécrétées lors d'un trauma ou après une chirurgie, pourraient donc favoriser la mise en place d'une infection par des pathogènes opportunistes comme *P. aeruginosa*.

Chapitre III : Effet des catécholamines sur des souches d'*Enterococcus faecalis*

I. Introduction

La majeure partie des bactéries qui constituent le microbiote intestinal humain (90%) appartient aux phyla des Firmicutes et des Bacteroidetes, qui regroupent à eux seuls plus de 100 espèces retrouvées au niveau intestinal (**Arumugam et al.**, 2011). *E. faecalis* fait partie du phylum des Firmicutes. Cette bactérie est présente au sein de la flore intestinale de nombreux hôtes, tels que les reptiles, les insectes ou encore les mammifères (**Dubin & Pamer**, 2018; **Mundt**, 1963) mais aussi parfois de la peau (**Shami et al.**, 2019). Des souches d'*E. faecalis* sont également utilisées depuis très longtemps dans l'industrie agroalimentaire notamment comme ferments lactiques dans la fabrication de fromage (**Giraffa et al.**, 1994), en raison de leurs capacités à se développer dans des conditions de forte salinité et à pH acide (**Wessels et al.**, 1990). Leurs activités protéolytiques et lipolytiques contribuent à l'affinage des fromages et à la production d'arômes (**Diaz et al.**, 1995; **Thompson & Marth**, 1986). Des souches d'*E. faecalis* sont aussi retrouvées dans d'autres aliments fermentés tels que des saucisses, des olives ou des végétaux. Certaines souches ont été proposées pour la biopréservation des aliments car elles produisent des bactériocines (entérocines), permettant d'inhiber la croissance de pathogènes des aliments ou bactéries de la flore d'altération (**Baccouri et al.**, 2019). *E. faecalis* est une bactérie également utilisée en tant que probiotique pour l'homme et les animaux (**Franz et al.**, 1999). Certains *E. faecalis* probiotiques sont en effet inclus dans des préparations pharmaceutiques comme la souche *E. faecalis* Symbioflor 1 clone DSM 16431, qui a été isolée de selles d'un humain adulte en bonne santé, et est utilisée depuis plus de 50 ans sans provoquer la moindre infection (**Fritzenwanker et al.**, 2013).Cependant, d'autres souches d'*E. faecalis* peuvent posséder de nombreux facteurs de virulence et ont été impliquées en tant que pathogènes opportunistes dans des infections nosocomiales, avec une part relative de 6,5% positionnant cette bactérie à la 3e place devant *P. aeruginosa* (Enquête nationale de prévalence 2017 https://www.santepubliquefrance.fr/). Ces bactéries sont en particulier responsables d'endocardites, d'infections du tractus urinaire ou encore de bactériémies. La résistance d'*E. faecalis* envers de nombreux antibiotiques, et sa capacité à former des biofilms responsables d'infections chroniques, posent actuellement de graves problèmes en milieu hospitalier. En effet, environ 65% des infections hospitalières sont liées à des biofilms bactériens (**Bjarnsholt**, 2013; **Potera**, 1999). En raison de ses facteurs de

virulence, de son rôle de pathogène opportuniste, et de sa capacité à transférer des gènes de résistance aux antibiotiques à d'autres microorganismes, *E. faecalis* ne possède pas le statut GRAS (Generally rocognized as safe) et son utilisation dans les aliments nécessite une étude au cas par cas (**Ogier & Serror**, 2008).

Au sein du corps humain, les cellules eucaryotes et procaryotes sont en constantes interactions et peuvent communiquer entre elles grâce à l'utilisation de molécules signal. Parmi celles-ci on peut citer les catécholamines (épinéphrine, norépinéphrine, dopamine), sécrétées par l'hôte, et libérées à la suite d'un effort physique ou d'un stress. Il a été montré précédemment que ces molécules peuvent favoriser la croissance des bactéries à Gram négatif telles qu'*E. coli*, *S. enterica* ou *V. cholerae* (**Halang et al.**, 2015; **Lyte & Ernst**, 1991) mais aussi promouvoir la formation de biofilm ou la virulence bactérienne (**Freestone et al.**, 2012; **Hegde et al.**, 2009; **Yang et al.**, 2014). Peu d'informations sont disponibles sur ce sujet concernant les bactéries à Gram positif. Quelques travaux ont montré que la norépinéphrine est capable de favoriser la croissance de *S. epidermis* (**Freestone et al.**, 1999; **Lyte et al.**, 2003), de *Streptococcus pneumoniae* (**Sandrini et al.**, 2014). et de bactéries impliquées dans des parodontites, *Actinomyces naeslundii* et *A. gerensceriae* (**Roberts et al.**, 2003). Des données plus récentes ont montré aussi que les catécholamines peuvent stimuler la croissance et la formation de biofilm chez *Cutibacterium acnes*, anciennement appelée *Propionibacterium acnes*, une bactérie à Gram positif présente au niveau de la peau et des glandes sébacées (**Borrel et al.**, 2019), et favoriser ainsi la production de lipides par les sébocytes.

Dans l'intestin ou au niveau cutané, des souches commensales, probiotiques ou pathogènes d'*E. faecalis* peuvent se retrouver au contact des catécholamines (norépinéphrine, épinéphrine). A notre connaissance, aucun travail de recherche n'a été effectué jusqu'à présent sur l'effet de ces molécules chez *E. faecalis*. Dans la suite de mes travaux de thèse, nous nous sommes donc intéressés, à étudier l'impact de la norépinéphrine et de l'épinéphrine sur la formation de biofilm de cette bactérie sur surface abiotique et son adhésion sur cellules eucaryotes.

Ces travaux ont permis de rédiger un article scientifique pour soumission dans *Frontiers in Microbiology* (Article 2).

II. Article 2

Influence of catecholamines (epinephrine/norepinephrine) on biofilm formation and adhesion in pathogenic and probiotic strains of *Enterococcus faecalis*

Mélyssa Cambronel[1]*, Flore Nilly[1]*, Amine Mohamed Boukerb[1], Olfa Baccouri[2], Valérie Borrel[1], Jérome Martel[1], Florian Fécamp[1], Rikki Knowlton[1], Kurt Zimmermann[3], Eugen Domann[4], Sophie Rodrigues[1], Marc Feuilloley[1], Nathalie Connil[1]

Influence of catecholamines (epinephrine/norepinephrine) on biofilm formation and adhesion in pathogenic and probiotic strains of Enterococcus faecalis

Melyssa Cambronel[1], Flore Nilly[1], Amine M. Boukerb[1], Olfa Baccouri[2], Valérie Borrel[1], Jérome Martel[1], Florian Fécamp[1], Rikki Knowlton[1], Kurt Zimmermann[3], Eugen Domann[4], Sophie Rodrigues[1], Marc G. Feuilloley[1], Nathalie Connil[5, 1*]

[1]EA4312 Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement, Université de Rouen, France, [2]Laboratory of Protein Engineering and Bioactive Molecules, University of Carthage, Tunisia, [3]SymbioPharm Gmbh, Germany, [4]German Center for Infection Research, University of Giessen, Germany, [5]Université de Rouen, France

In review

Submitted to Journal:
Frontiers in Microbiology

Specialty Section:
Microbial Physiology and Metabolism

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
520853

Received on:
16 Dec 2019

Frontiers website link:
www.frontiersin.org

Conflict of interest statement

The authors declare a potential conflict of interest and state it below

KZ was employed by company SymbioPharm GmbH and provided the E. faecalis Symbioflor 1 strain for the experiments. All the other authors declare no competing interests. The research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author contribution statement

NC designed and supervised the project. MC, FN and SR carried out most of the experiments and analyzed the data. OB, JM and JF participated in biofilm quantification by crystal violet. SR performed the biofilm analysis by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). VB participated in the adhesion assay on eukaryotic cells. AMB conducted genome sequencing of E. faecalis OB15 and E. faecalis MMH594 and helped for bioinformatic analysis. MC, AMB, SR, RK, MF and NC wrote and read the manuscript. All authors approved the final version.

Keywords

E faecalis, Biofilm, Adhesion, adrenergic sensor, VicK

In review

Abstract

Word count: 349

Enterococcus faecalis has controversial status due to its emerging role in nosocomial infections, while some strains with beneficial effects are used as probiotics and starter cultures in dairy industry. These bacteria can be found as resident or transient germs in the gut or on skin, where they are continually exposed to various eukaryotic molecules. In this context, the aim of our work was to evaluate the effect of the catecholamine stress hormones, epinephrine (Epi) and norepinephrine (NE) on some Enterococcus strains. Four E. faecalis strains were included in this study: E. faecalis MMH594 and E. faecalis V583, pathogenic strains of clinical origin, E. faecalis Symbioflor 1 clone DSM 16431, a pharmaceutical probiotic, and E. faecalis OB15, a probiotic strain previously isolated from Tunisian rigouta (Baccouri et al, 2019). Epi was found to modulate the formation of biofilm (biovolume, thickness) in E. faecalis, for most of the four strains tested, whether pathogens or probiotics. On the contrary, NE had less effect on biofilm formation of these bacteria. We also investigated the effect of Epi and NE on adhesion of E. faecalis to eukaryotic cells as it is the first step of colonization of the host. Epi was found to significantly enhance the adhesion of E. faecalis MMH594 and E. faecalis OB15 to Caco-2/TC7 intestinal cells, whereas NE only significantly increased the adhesion of E. faecalis V583 to these cells. Epi also promoted the adhesion of E. faecalis MMH594 and E. faecalis OB15 on HaCaT keratinocyte cells. Analysis of a putative adrenergic sensor of Epi/NE in E. faecalis, compared to QseC, the E. coli adrenergic receptor, allowed the identification of VicK as the nearest protein to QseC with 29% identity and 46% similarity values. This protein was well conserved within the four E. faecalis strains studied. In conclusion, this study showed for the first time that stress hormones could increase biofilm formation and adhesion to eukaryotic cells in E. faecalis. Future experiments will aim to decipher the mechanisms involved in these effects, and to confirm the role of VicK as the putative adrenergic sensor in E. faecalis probiotic and pathogen strains.

Contribution to the field

This is the first report of the effect of adrenaline on pathogenic and probiotic strains of Enterococcus faecalis.

Ethics statements

Studies involving animal subjects

Generated Statement: No animal studies are presented in this manuscript.

Studies involving human subjects

Generated Statement: No human studies are presented in this manuscript.

Inclusion of identifiable human data

Generated Statement: No potentially identifiable human images or data is presented in this study.

Influence of catecholamines (epinephrine/norepinephrine) on biofilm formation and adhesion in pathogenic and probiotic strains of *Enterococcus faecalis*.

Mélyssa Cambronel[1]*, Flore Nilly[1]*, Amine Mohamed Boukerb[1], Olfa Baccouri[2], Valérie Borrel[1], Jérome Martel[1], Florian Fécamp[1], Rikki Knowlton[1], Kurt Zimmermann[3], Eugen Domann[4], Sophie Rodrigues[1], Marc Feuilloley[1], Nathalie Connil[1]

[1]Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) EA 4312, Université de Rouen, Normandie Université, Évreux, France.

[2]Laboratory of Protein Engineering and Bioactive Molecules (LIP-MB), National Institute of Applied Sciences and Technology. University of Carthage, B.P. 676, 1080 Tunis Cedex, Tunisia.

[3]SymbioPharm GmbH, Herborn, Germany.

[4]Institute of Medical Microbiology, German Centre for Infection Research, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany.

*These authors have equitably contributed to the supervision of this work

Corresponding author: nathalie.connil@univ-rouen.fr (Nathalie Connil)

In review

Abstract

Enterococcus faecalis has controversial status due to its emerging role in nosocomial infections, while some strains with beneficial effects are used as probiotics and starter cultures in dairy industry. These bacteria can be found as resident or transient germs in the gut or on skin, where they are continually exposed to various eukaryotic molecules. In this context, the aim of our work was to evaluate the effect of the catecholamine stress hormones, epinephrine (Epi) and norepinephrine (NE) on some *Enterococcus s*trains. Four *E. faecalis* strains were included in this study: *E. faecalis* MMH594 and *E. faecalis* V583, pathogenic strains of clinical origin, *E. faecalis* Symbioflor 1 clone DSM 16431, a pharmaceutical probiotic, and *E. faecalis* OB15, a probiotic strain previously isolated from Tunisian rigouta (Baccouri et al, 2019). Epi was found to modulate the formation of biofilm (biovolume, thickness) in *E. faecalis*, for most of the four strains tested, whether pathogens or probiotics. On the contrary, NE had less effect on biofilm formation of these bacteria. We also investigated the effect of Epi and NE on adhesion of *E. faecalis* to eukaryotic cells as it is the first step of colonization of the host. Epi was found to significantly enhance the adhesion of *E. faecalis* MMH594 and *E. faecalis* OB15 to Caco-2/TC7 intestinal cells, whereas NE only significantly increased the adhesion of *E. faecalis* V583 to these cells. Epi also promoted the adhesion of *E. faecalis* MMH594 and *E. faecalis* OB15 on HaCaT keratinocyte cells. Analysis of a putative adrenergic sensor of Epi/NE in *E. faecalis*, compared to QseC, the *E. coli* adrenergic receptor, allowed the identification of VicK as the nearest protein to QseC with 29% identity and 46% similarity values. This protein was well conserved within the four *E. faecalis* strains studied. In conclusion, this study showed for the first time that stress hormones could increase biofilm formation and adhesion to eukaryotic cells in *E. faecalis*. Future experiments will aim to decipher the mechanisms involved in these effects, and to confirm the role of VicK as the putative adrenergic sensor in *E. faecalis* probiotic and pathogen strains. This may help to develop new strategies of antagonism/competition in the gut or skin ecological niches, and to prevent the colonization by opportunistic pathogens.

Keywords: *E. faecalis,* biofilm, adhesion, adrenergic sensor, VicK

In review

Introduction

Enterococcus faecalis, is a Gram-positive bacterium which belongs to the Firmicutes group, one of the two most represented phyla in the gut, along with Bacteroidetes (**Arumugam et al.**, 2011), both gathering around 90% of the 1000 species found in the intestinal microbiota (**Sekirov et al.**, 2010). This bacterium is a normal resident of the gastrointestinal tract of many hosts as insects, birds, reptiles, and mammals (**Dubin & Pamer**, 2018), but can also be present in the skin (**Shami et al.**, 2019).

Strains of *E. faecalis* have been used for a very long time in the food industry, particularly as lactic ferments in the manufacture of cheese (**Giraffa et al.**, 1994), because of their ability to develop under conditions of high salinity and acidic pH (**Wessels et al.**, 1990). Their proteolytic and lipolytic activities contribute to the maturing of cheeses and the production of flavors (**Thompson & Marth**, 1986). This germ can be found as well in other fermented foods such as sausages, olives or plants. Some strains have been proposed for food biopreservation because they produce bacteriocins (enterocins), which can inhibit the growth of pathogens in food, or the development of spoilage bacteria (**Baccouri et al.**, 2019).

Some strains of *E. faecalis* have been used also as probiotics for humans and/or animals. Indeed, this is the case of *E. faecalis* Symbioflor 1 clone DSM 16431.This strain was first isolated from the stool of a healthy adult human in the 1950s, and then used for more than 50 years without any report of infections (**Fritzenwanker et al.**, 2013), and now included in pharmaceutical preparations (SymbioPharm, Herborn,Germany). This probiotic formulation has been recommended for respiratory tract infections such as influenza, colds, sinusitis, otitis and/or bronchitis. In animals, enterococcal probiotics are mainly used to treat or prevent diarrhoea, for immune stimulation or to improve growth (**Franz et al.**, 1999).

However, some strains of *E. faecalis* can have many virulence factors and have been implicated as opportunistic pathogens in nosocomial infections, particularly endocarditis, urinary tract infections or bacteremia. The resistance of *E. faecalis* to many antibiotics and its ability to form biofilms responsible for chronic infections is currently a serious problem in hospitals, as it has been estimated that approximately 65% of hospital infections involve bacterial biofilm (**Potera**, 1999; **Bjarnsholt**, 2013). Thus, due to its virulence factors, its role as an opportunistic pathogen, and its ability to transfer antibiotic resistance genes to other microorganisms, *E. faecalis* does not have GRAS (Generally Recognized As Safe) status and its use in food requires a case-by-case study (**Ogier & Serror**, 2008).

Inside the human body, eukaryotic and prokaryotic cells can communicate through signal molecules, secreted by host cells. It has been well described that molecules released under stress can impact the physiological behavior of bacteria (**Freestone et al.**, 2008). Stress or physical effort leads to the presence of catecholamines: epinephrine (Epi), norepinephrine (NE) and dopamine) in the human body. These molecules have been found to improve the growth of many Gram-negative bacteria, including several pathogens like *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*e or *Salmonella enterica* (**Lyte & Ernst**, 1992; **Halang et al.**, 2015). Epi and NE can also modulate the virulence and the biofilm formation capacity of various bacteria (**Freestone et al.**, 2012; **Hegde et al.**, 2009; **Yang et al.**, 2014). However, very few studies regarding the effect of catecholamines on Gram-positive bacteria have been conducted. Sandrini et al. showed that NE was able to increase the growth and biofilm production of *Staphylococcus pneumoniae*, and the expression of genes involved in host colonization (**Sandrini et al.**, 2014). This molecule was also found to enhance growth and biofilm in *S. epidermidis* (**Freestone et al.**, 1999; **Lyte et al.**, 2003). Williams and co-workers showed that growth of *Actinomyces naeslundii* and *A. gerenscseriae*, bacteria involved in periodontal diseases, was increased in presence of both NE and Epi (**Roberts et al.**, 2003). More recently, it has been additionally demonstrated that catecholamines (Epi and NE) had no impact on the growth of the Gram-positive bacterium

In review

Cutibacterium acnes, but these molecules were able to promote its biofilm formation (**Borrel et al.**, 2019).

The sensitivity of prokaryotes to host signal molecules requires the presence of bacterial sensors (**Lesouhaitier et al.**, 2009). For this, bacteria have developed various mechanisms, including the presence of two-component systems. In the pathogen *E. coli* O157:H7, the two-component systems QseBC and QseEF have been shown to be involved in the response to Epi and NE (**Rasko et al.**, 2008; **Zhu et al.**, 2006). Adrenergic sensors exist also in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (**Karavolos et al.**, 2008; **Moreira & Sperandio**, 2012).

Till now, to our knowledge, no sensors of Epi/NE have been identified in *E. faecalis* (or other Gram-positive bacteria). However, on skin or in gut, pathogenic, commensal or probiotic strains of *E. faecalis* can be in contact with these catecholamines at the production and/or action sites. In this context, the aim of our study was to investigate for the first time the impact of these molecules on *E. faecalis* biofilm formation and adhesion.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

Four *E. faecalis* strains were used in this study, two pathogenic strains : MMH594 (**Huycke et al.**, 1991) and V583 (**Sahm et al.**, 1989), isolated from blood, and two probiotic strains : OB15 isolated from Rigouta, a Tunisian traditional fermented dairy product (**Baccouri et al.**, 2019) and Symbioflor 1 DSM 16431 isolated from a stool specimen of an healthy human adult (Symbiopharm, Herborn, Allemagne). Bacteria were routinely grown at 37°C under static conditions in Brain Heart Infusion (BHI).

In review

Comparative phylogenomic analysis

E. faecalis OB15 has been obtained previously **(Baccouri et al, 2019)**, and the genome sequences of the four strains were compared to each other to provide a robust measurement of their genetic distance. For this, the average nucleotide identity (ANI) and the genome-to-genome distance calculator (GGDC) were analyzed using PYANI v0.2.7, and isDDH at ggdc.dsmz.de/ggdc.php, respectively.

Biofilms on polystyrene surface

E. faecalis strains were grown in 96-wells microplates under static conditions, in BHI medium, with or without Epi or NE (1 or 100 µM) for 24 h at 37°C. At the end of incubation, microplates were washed three times with water, then biofilms were stained with 0.1% crystal violet for 15 min and dried 10 min at 37°C. Crystal violet was then resuspended with 100 % ethanol and OD was measured at 595 nm using a multiple plate reader Spark (Tecan).

Biofilms on glass surface

E. faecalis strains were grown in 24-well glass-bottom microplates under static conditions, in BHI medium containing 1% glucose, with or without Epi or NE (1 µM), for 24 h at 37 °C. At the end of incubation, microplates were washed three times with sterile physiological water, stained with 5 µM of SYTO® 9 green fluorescent nucleic acid stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) for 15 min, then washed twice and observed by confocal laser scanning microscopy.

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Biofilm observations were performed with a Zeiss LSM710 (Zeiss, Germany) using a 40x oil immersion objective. Bacteria were detected by monitoring the SYTO® 9 green fluorescence. This fluorochrome was excited at 488 nm and fluorescence emission was detected between 500 and 550 nm. Images were taken every micrometer throughout the whole biofilm depth. For visualization and processing of three-dimensional (3D) image data, the Zen 2.1 software (Zeiss,

Germany) was used. Quantitative analyses of image stacks were performed using the COMSTAT 2 software (http://www.imageanalysis.dk/) (**Heydorn et al.**, 2000; **Vorregaard,** 2008). At least three image stacks from each of three independent experiments were used for each analysis.

Cell culture

Caco-2/TC7 colon adenocarcinoma cells and HaCaT keratinocyte cells were grown in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) containing 15% and 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) respectively, and penicillin/streptomycin (100 µg/mL). Cells were cultivated at 37°C, in 5% CO_2 - 95% air atmosphere, and the medium was regularly changed. For adhesion assay, cells were seeded in 24-well culture plates treated for tissue culture and were used at confluence.

Adhesion assay

E. faecalis strains were grown for 2 h with or without 1 µM Epi or NE, and then bacterial cells were centrifuged at 8000xg for 10 min. The cell pellets were resuspended in DMEM without FBS and antibiotics, at a concentration of 10^8 CFU/mL, and applied on the confluent cell monolayers. After 2 h of incubation, Caco-2/TC7 or HaCaT cells were washed twice with PBS (Phosphate Buffer Saline) to remove non adherent bacteria, and then disrupted with 0.1% Triton 100x. The lysates were then diluted and plated on BHI agar, to determine the number of adherent bacteria.

***In silico* analysis of putative adrenergic sensors**

Sensors homolog to QseC, the bacterial adrenergic sensor identified in *E. coli* strain K-12 (P40719.2), were screened in our *E. faecalis* genome sequences using BLASTp with default parameters. CLUSTALX2 v.2.1 was used for multiple alignment of the obtained protein sequences. The created aligned file was visualized with Jalview 2 (**Waterhouse et al.**, 2009).

Statistical analysis

Data are expressed as means ± standard error (SE) of minimum three experiments done in triplicate. GraphPad Prism 8.1.2 and paired *t*-test were used for analysis of statistical significance to compare the means within the same set of experiments. Statistical significance was determined at $p<0.05$.

Results

Average nucleotide identity (ANI) analysis

Nucleotide-level genomic similarity between coding-regions of the four genomes, with *E. durans* strain KLDS6093 (CP012384.1) as an outliner, showed that the two probiotics *E. faecalis* OB15 and *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431 (NC 019770.1) were close to each other (Figure 1) in terms of genomic distance (99.62%), and also the two pathogens MMH594 and V583 (99.90%). Conversely, the distance between the probiotics and the pathogens strains was greater (98.97-99%).

Biofilm quantification by crystal violet

A polystyrene surface was used to study the impact of Epi and NE on *E. faecalis* biofilm production on abiotic surface (Figure 2). The results showed that biofilm formation of the pathogenic strains (MMH594 and V583) were not modified by a treatment with 1 or 100 µM Epi (Figure 2A). On the contrary, this substance slightly enhanced the biofilm formation of the probiotic strains. The modulation observed for *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431 was not

In review

statistically significant, but for *E. faecalis* OB15 the biofilm increased by 22%±2% when the bacterium was treated with 1 µM Epi, and by 15%±1% for 100 µM. Figure 2B shows the results obtained with NE. This catecholamine was found to have no effect in our experimental conditions on the biofilm formation on polystyrene surface of the four strains of *E. faecalis* studied.

Biofilm analysis and quantification by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

As quantification of biofilms with crystal violet is not a precise test, biofilm formation of *E. faecalis* strains, treated or not with 1 µM of Epi or NE were then studied on glass surface and measured by CLSM (Figure 3). The results showed that 3D structure of *E. faecalis* biofilms was homogeneous except for *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431 which was not, and quite different from the three other strains studied, as can be seen in Figure 3A and Figure 3B. Three biofilm parameters were estimated (biovolume, average and maximum thicknesses). The results showed that Epi (Figure 3A) significantly increased the biovolumes of the pathogenic strain *E. faecalis* V583 (+87% ±47%) and the probiotic strain *E. faecalis* OB15 (+25%±3%), the average and maximum thicknesses of *E. faecalis* V583 (+90±68%, +31±14%), and of the two probiotic strains *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431 (+39±3%, +14±2%) and *E. faecalis* OB15 (+27±6%, +10±3%), compared to the biofilm values obtained with the untreated control bacteria. An increase of these parameters was also observed for *E. faecalis* MMH594 biofilms after treatment with Epi, but the values obtained were not statistically significant compared to control without the molecule. The results of the same experiment conducted with NE are visible in Figure 3B. This catecholamine also led to a small increase of biofilms (biovolume, average and maximum thicknesses) for all the strains of *E. faecalis* tested, but the data obtained were not statistically significant compared to those of the untreated bacteria.

In review

Adhesion on eukaryotic cells

Pathogenic and probiotic strains of *E. faecalis* were treated for 2 h with 1 µM Epi or NE, then incubated on Caco-2/TC7 intestinal cells to study bacterial adhesion. The results obtained are presented on Figure 4. Epi was found to enhance significantly the adhesion of *E. faecalis* MMH594 (fold change of 1.23) and *E. faecalis* OB15 (fold change of 1.66). NE increased the adhesion of *E. faecalis* V583 (fold change of 1.46) and *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431 (fold change 1.75), but the enhancement of adhesion for this latter strain was not statistically significant because of disparate values. The same experiment has been conducted on HaCaT keratinocyte cells with bacteria pretreated with Epi (Figure 5). As previously found for Caco-2/TC7 cells, a treatment of the bacteria with 1 µM Epi led to a significant enhancement of adhesion for *E. faecalis* MMH594 (fold change of 2) and *E. faecalis* OB15 (fold change of 1.45). An increase was also observed for *E. faecalis* V583 and *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431, but these variations were not statistically significant.

***In silico* analysis of putative adrenergic sensors**

Sensors homolog to QseC, the *E. coli* adrenergic sensor, were investigated in the four *E. faecalis* strains of the study, by BLASTp analysis, using *E. coli* K12 as the target sequence for multiple protein sequences alignment (Figure 6). BLASTp analysis allowed the identification of VicK (WalK) as the nearest protein to QseC with 29% identity and 46% similarity values. Multiple alignment showed that VicK sequence is well conserved within the four *E. faecalis* strains studied, with identification of variants. Indeed, we found two amino-acid changes at positions 478 (Cys for pathogens, and Arg for probiotics and QseC at position 336), and 449 (Leu for the two pathogens and DSM 16431, Phe for OB15 and Val for QseC at position 357).

Discussion

Bi-directional dialogue between host and microbe have now been studied for more than two decades and this has led to the proposal of the field of microbial endocrinology (**Lyte**, 1993). Many eukaryotic molecules (neurotransmitters, immune modulators, peptide hormones) can be sensed by bacteria in the host (**Lesouhaitier et al.**, 2009), and among these substances the effect of catecholamines (Epi/NE) has been widely investigated. These stress hormones have been shown to be able to stimulate the growth of some Gram-negative pathogens such as *E. coli*, *Vibrio cholera*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica,* hence promoting virulence and the establishment of infection (**Sarkodie et al.**, 2019). Since catechol rings are known siderophores in bacteria, catecholamines have been shown to serve as auxiliary siderophores that enhance growth of some Gram-negative bacteria by improving iron uptake in growth-limiting media (**Kinney et al.**, 2000). Stress hormones, Epi and NE, can also affect the growth of anaerobic bacteria such as *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella* spp., *Porhyromonas* spp., *Tanerella forsythia* and *Propionibacterium acnes*. (**Boyanova**, 2017). The effects of Epi and NE are species-specific, sometimes strain-specific and can lead to a growth increase or decrease, or no effect on the growth (**Belay et al.**, 2003). Till now, very few data are available on Gram-positive bacteria, so we decided to investigate the effect of Epi and NE on *E. faecalis* as this germ can be in contact with these molecules in gut or on the skin. For this, we selected four strains of *E. faecalis,* two pathogens: MMH594 (**Huycke et al.**, 1991) and V583 (**Sahm et al.**, 1989), and two probiotics: OB15 (**Baccouri et al.**, 2019) and Symbioflor 1 DSM 16431 (**Fritzenwanker et al.**, 2013).The genomic distances between these bacteria were first measured using ANI and the Genome-to-Genome Hybridization similarity methods. As could be expected, the results obtained showed that the two probiotics *E. faecalis* OB15 and *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431 were close to each other in terms of genomic distance (99,62%), also the two pathogens MMH594 and V583 (99.90%), whereas the distance between the probiotics and pathogens strains was greater (98.97-99%). In the following experiments, the effect of Epi or NE on *E. faecalis* biofilm formation and adhesion has been investigated for these four strains, in order to see if this behavior seems to be strain specific. Quantification by crystal violet of *E. faecalis* biofilms grown on polystyrene surface showed that Epi (1 or 100 µM) only modulates biofilm formation of the probiotic strains OB15 and Symbioflor 1 DSM 16431, whereas NE had no effect in our experimental conditions whatever the strains used for this test. As quantification of biofilms by crystal violet is not a precise experiment, we then examined the structures of *E. faecalis* biofilms by CLSM after growth of the bacteria on glass surfaces with or without treatment with 1 µM of catecholamines (Epi or NE). Three parameters of the biofilms were estimated (biovolume, average and maximum thicknesses), and the results showed that Epi was able to modulate these values significantly or not, in almost all the four bacteria tested, whether pathogens or probiotics. On the contrary, NE had less effect on biofilm formation of these bacteria. In the literature, the capacity of catecholamines to enhance the formation of biofilms has been previously observed for several Gram-negative bacteria, including *E. coli* O157:H7 (**Bansal et al.**, 2007), *V. harveyi* (**Yang et al.**, 2014) and *Pseudomonas aeruginosa* (**Freestone et al.,** 2012). Few studies have been conducted on Gram-positive bacteria. Catecholamines have been found to enhance biofilm production in *S. pneumoniae* (**Sandrini et al.**, 2014), *S. epidermidis* (**Freestone et al.**, 1999; **Lyte et al.**, 2003), and *C. acnes* (**Borrel et al.**, 2019). Growth of *A. naeslundii* and *A. gerenscseriae*, was increased in presence of both NE and Epi (**Roberts et al.**, 2003). On the contrary, in our study, catecholamines were found to have no effect on *E. faecalis* growth (data not shown). As the first step of biofilm formation during colonization of the host is adhesion, we then decided to investigate the effect of Epi and NE on adhesion of *E. faecalis* to eukaryotic cells. Epi was found to significantly enhance the adhesion of *E. faecalis* MMH594 and *E. faecalis* OB15 to

In review

Caco-2/TC7 intestinal cells, whereas NE only significantly increased the adhesion of *E. faecalis* V583 to these cells. Epi also promoted the adhesion of *E. faecalis* MMH594 and *E. faecalis* OB15 on HaCaT keratinocyte cells. Analysis of a putative adrenergic sensor of Epi/NE in *E. faecalis*, compared to QseC, the *E. coli* adrenergic receptor, allowed the identification of VicK as the nearest protein to QseC with 29% identity and 46% similarity values. This protein is part of the two-component system VicKR also known in the literature as WalKR or YycGF. This two-component system also exists in other Gram-positive bacteria, and has been described for example, as essential for the bacterial growth of *B. subtilis*, and bacterial wall metabolism in *Staphylococcus aureus* (**Dubrac et al**., 2007; **Dhiman et al.**, 2014).

Conclusion

Taken together, the results of our study showed for the first time that catecholamines (Epi and NE) can modulate not only the biofilm formation and adhesion to eukaryotic cells of pathogenic bacteria, but also probiotic strains. Thus, catecholamines in human body may participate in competition for the ecological niche by acting both on pathogens and probiotics. Future works will be needed to confirm the role of VicK as the sensor of these molecules in *E. faecalis.*

Author contributions

NC designed and supervised the project. MC, FN and SR carried out most of the experiments and analyzed the data. OB, JM and JF participated in biofilm quantification by crystal violet. SR performed the biofilm analysis by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). VB participated in the adhesion assay on eukaryotic cells. AMB conducted genome sequencing of *E. faecalis* OB15 and *E. faecalis* MMH594 and helped for bioinformatic analysis. MC, AMB, SR, RK, MF and NC wrote and read the manuscript. All authors approved the final version.

In review

Acknowledgments

This work was supported by Evreux Porte de Normandie, Region Normandie and European Union (FEDER).

Conflict of Interest Statement

KZ was employed by company SymbioPharm GmbH and provided the *E. faecalis* Symbioflor 1 strain for the experiments. All the other authors declare no competing interests. The research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H.B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E.G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W.M., Brunak, S., Doré, J., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Bork, P., Blottiere, H.M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariaz, G., Dervyn, R., Foerstner, K.U., Friss, C., Guchte, M. van de, Guedon, E., Haimet, F., Huber, W.,

Hylckama-Vlieg, J. van, Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Kristiansen, K., Lakhdari, O., Layec, S., Roux, K. Le, Maguin, E., Mérieux, A., Minardi, R.M., M'rini, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Bork, P., 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. Nature 473, 174–180.

Baccouri, O., Boukerb, A.M., Farhat, L. Ben, Zébré, A., Zimmermann, K., Domann, E., Cambronel, M., Barreau, M., Maillot, O., Rincé, I., Muller, C., Marzouki, M.N., Feuilloley, M., Abidi, F., Connil, N., 2019. Probiotic Potential and Safety Evaluation of *Enterococcus faecalis* OB14 and OB15, Isolated From Traditional Tunisian Testouri Cheese and Rigouta, Using Physiological and Genomic Analysis. Front. Microbiol. 10, 881.

Bansal, T., Englert, D., Lee, J., Hegde, M., Wood, T., Jayaraman, A., 2007. Differential Effects of Epinephrine, Norepinephrine, and Indole on *Escherichia coli* O157:H7 Chemotaxis, Colonization, and Gene Expression. Infect. Immun. 75, 4597–4607.

Belay, T., Aviles, H., Vance, M., Fountain, K., Sonnenfeld, G. 2003.Catecholamines and in vitro growth of pathogenic bacteria: enhancement of growth varies greatly among bacterial species. Life Sci. 8;73(12):1527-35.

Bjarnsholt, T., 2013. The role of bacterial biofilms in chronic infections. APMIS 121, 1–58.

Borrel, V., Thomas, P., Catovic, C., Racine, P.-J., Konto-Ghiorghi, Y., Lefeuvre, L., Duclairoir-Poc, C., Zouboulis, C.C., Feuilloley, M.G.J., 2019. Acne and Stress: Impact of Catecholamines on *Cutibacterium acnes*. Front. Med. 6, 155.

Dhiman, A., Bhatnagar, S., Kulshreshtha, P., Bhatnagar, R., 2014. Functional characterization of WalRK: A two-component signal transduction system from *Bacillus anthracis*. FEBS Open Bio 4, 65–76.

Dubin, K., Pamer, E.G., 2018. Enterococci and Their Interactions with the Intestinal Microbiome, in: Bugs as Drugs. American Society of Microbiology, pp. 309–330.

Dubrac, S., Boneca, I.G., Poupel, O., Msadek, T., 2007. New Insights into the WalK/WalR (YycG/YycF) Essential Signal Transduction Pathway Reveal a Major Role in Controlling Cell Wall Metabolism and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 189, 8257–8269.

Franz, C.M., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E., 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? Int. J. Food Microbiol. 47, 1–24.

Freestone, P.P., Sharaff, F., O'Callaghan, C., Fry, H., Hirst, R.A., Sandrini, S.M., Hyman, S., 2012. *Pseudomonas aeruginosa* -Catecholamine Inotrope Interactions. Chest 142, 1200–1210.

Freestone, P.P.E., Haigh, R.D., Williams, P.H., Lyte, M., 1999. Stimulation of bacterial growth by heat-stable, norepinephrine-induced autoinducers. FEMS Microbiol. Lett. 172, 53–60.

Freestone, P.P.E., Sandrini, S.M., Haigh, R.D., Lyte, M., 2008. Microbial endocrinology:

in review

how stress influences susceptibility to infection. Trends Microbiol. 16, 55–64.

Fritzenwanker, M., Kuenne, C., Billion, A., Hain, T., Zimmermann, K., Goesmann, A., Chakraborty, T., Domann, E., 2013. Complete Genome Sequence of the Probiotic *Enterococcus faecalis* Symbioflor 1 Clone DSM 16431. Genome Announc. 1.

Giraffa, G., Neviani, E., Tarelli, G.T., 1994. Antilisterial Activity by Enterococci in a Model Predicting the Temperature Evolution of Taleggio, an Italian Soft Cheese. J. Dairy Sci. 77, 1176–1182.

Halang, P., Toulouse, C., Geißel, B., Michel, B., Flauger, B., Müller, M., Voegele, R.T., Stefanski, V., Steuber, J., 2015. Response of *Vibrio cholerae* to the Catecholamine Hormones. J. Bacteriol. 197, 3769–3778.

Hegde, M., Wood, T.K., Jayaraman, A., 2009. The neuroendocrine hormone norepinephrine increases *Pseudomonas aeruginosa* PA14 virulence through the las quorum-sensing pathway. Appl. Microbiol. Biotechnol. 84, 763–776.

Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B.K., Molin, S., 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. Microbiology 146, 2395–2407.

Huycke, M.M., Spiegel, C.A., Gilmore, M.S., 1991. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. 35, 1626–1634.

Karavolos, M., Spencer, H., Bulmer, D., Thompson, A., Winzer, K., Williams, P., Hinton, J., Khan, C.A., 2008. Adrenaline modulates the global transcriptional profile of *Salmonella* revealing a role in the antimicrobial peptide and oxidative stress resistance responses. BMC Genomics 9, 458.

Kinney, K.S., Austin, C.E., Morton, D.S., Sonnenfeld, G., 2000. Norepinephrine as a growth stimulating factor in bacteria--mechanistic studies. Life Sci. 67, 3075–85.

Laverty, G., Gorman, S.P,, Gilmore, B.F. 2014. Biomolecular Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilm Formation. Pathogens. 3(3):596-632.

Lesouhaitier, O., Veron, W., Chapalain, A., Madi, A., Blier, A.-S., Dagorn, A., Connil, N., Chevalier, S., Orange, N., Feuilloley, M., 2009. Gram-Negative Bacterial Sensors for Eukaryotic Signal Molecules. Sensors 9, 6967–6990.

Lyte, M., 1993. The role of microbial endocrinology in infectious disease. J. Endocrinol. 137, 343–345.

Lyte, M., Ernst, S., 1991. Catecholamine induced growth of Gram negative bacteria. Pergamon Press 50, 203–212.

Lyte, M., Freestone, P.P.E., Neal, C.P., Olson, B.A., Haigh, R.D., Bayston, R., Williams, P.H., 2003. Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes. Lancet 361, 130–135.

Moreira, C.G., Sperandio, V., 2012. Interplay between the QseC and QseE Bacterial

In review

Adrenergic Sensor Kinases in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Pathogenesis. Infect. Immun. 80, 4344–4353.

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

Potera, C., 1999. Microbiology:Forging a Link Between Biofilms and Disease. Science (80-.). 283, 1837–1839.

Rasko, D.A., Moreira, C.G., Li, D.R., Reading, N.C., Ritchie, J.M., Waldor, M.K., Williams, N., Taussig, R., Wei, S., Roth, M., Hughes, D.T., Huntley, J.F., Fina, M.W., Falck, J.R., Sperandio, V., 2008. Targeting QseC Signaling and Virulence for Antibiotic Development. Science (80-.). 321, 1078–1080.

Roberts, A., Matthews, J.B., Socransky, S.S., Freestone, P.P.E., Williams, P.H., Chapple, I.L.C., 2003. Stress and the periodontal diseases: effects of catecholamines on the growth of periodontal bacteria *in vitro*. Oral Microbiol. Immunol. 17, 296–303.

Sahm, D.F., Kissinger, J., Gilmore, M.S., Murray, P.R., Mulder, R., Solliday, J., Clarke, B., 1989. In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis.* Antimicrob. Agents Chemother. 33, 1588–91.

Sandrini, S., Alghofaili, F., Freestone, P., Yesilkaya, H., 2014. Host stress hormone norepinephrine stimulates pneumococcal growth, biofilm formation and virulence gene expression. BMC Microbiol. 14, 1–12.

Sarkodie, E.K., Naveed, M., Mirjat, A.A., Saeed, M., Zhou, S., Baig, M.M.F.A., Baidoo, S.A., Ihsan, A.U., Shah, K.B., Ayuba, A., Ali, D.C., Chu, W., 2019. Influences of stress hormones on microbial infections. Microb. Pathog. 131, 270–276.

Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., Finlay, B.B., 2010. Gut Microbiota in Health and Disease. Physiol. Rev. 90, 859–904.

Shami, A., Al-Mijalli, S., Pongchaikul, P., Al-Barrag, A., AbduRahim, S., 2019. The prevalence of the culturable human skin aerobic bacteria in Riyadh, Saudi Arabia. BMC Microbiol. 19, 189.

Thompson, T., Marth, E., 1986. Changes in Parmesan cheese during ripening: Microflora-coliforms, enterococci, anaerobes, propionibacteria and staphylococci. Milchwissenschaft.

Vorregaard M. 2008. Comstat2—a modern 3D image analysis environment **for** biofilms, in Informatics and Mathematical Modelling. Technical University of Denmark: Kongens Lyngby, Denmark.

Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A, Clamp, M., Barton, G.J 2009. Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. Bioinformatics 25: 1189-1191.

Wessels, D., Jooste, P.J., Mostert, J.F., 1990. Technologically important characteristics of *Enterococcus* isolates from milk and dairy products. Int. J. Food Microbiol. 10, 349–52.

In review

470 **Yang, Q., Anh, N.D.Q., Bossier, P., Defoirdt, T.**, 2014. Norepinephrine and dopamine
471 increase motility, biofilm formation, and virulence of *Vibrio harveyi.* Front. Microbiol. 5,
472 1–12.

473 **Zhu, C., Sperandio, V., Boedeker, E.C., Hughes, D.T., Clarke, M.B.**, 2006. The QseC sensor
474 kinase: A bacterial adrenergic receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. 103, 10420–10425.

475

476

477 **Figure captions**

478 **Figure 1.** Heat-map of Average Nucleotide Identity (ANI) between *E. faecalis* Symbioflor 1
479 clone DSM 16431, *E. faecalis* OB15, *E. faecalis* MMH594 and *E. faecalis* V583.
480
481 **Figure 2.** Effect of Epi (Fig2A) and NE (Fig2B) on biofilm formation of *E. faecalis* on
482 polystyrene surface, quantified by crystal violet. ns: not significant, * P<0.05, ** P<0.01
483
484 **Figure 3.** Effect of Epi (Fig3A) and NE (Fig3B) on biofilm formation (biovolume, average
485 thickness, maximum thickness) of *E. faecalis* on glass surface, measured by SYTO® 9 green
486 fluorescent nucleic acid staining and confocal laser scanning microscopy (CLSM). * P<0.05,
487 ** P<0.01
488
489 **Figure 4.** Effect of Epi and NE on adhesion of *E. faecalis* (MMH594, V583, DSM 16431,
490 OB15) to Caco-2/TC7 intestinal cells. ns: not significant, * P<0.05, ** P<0.01
491
492 **Figure 5.** Effect of Epi on adhesion of *E. faecalis* (MMH594, V583, DSM 16431, OB15)
493 HaCaT keratinocyte cells. ns: not significant, * P<0.05
494
495 **Figure 6.** Multiple alignment of the four VicK amino-acid sequence with QseQ from *E. coli*
496 strain K-12. Shared amino-acids are boxed. Asterisks indicated different amino-acids between
497 *E. faecalis* strains.
498
499
500

501

502

503

504

505

506

In review

Figure 1.JPEG

In review

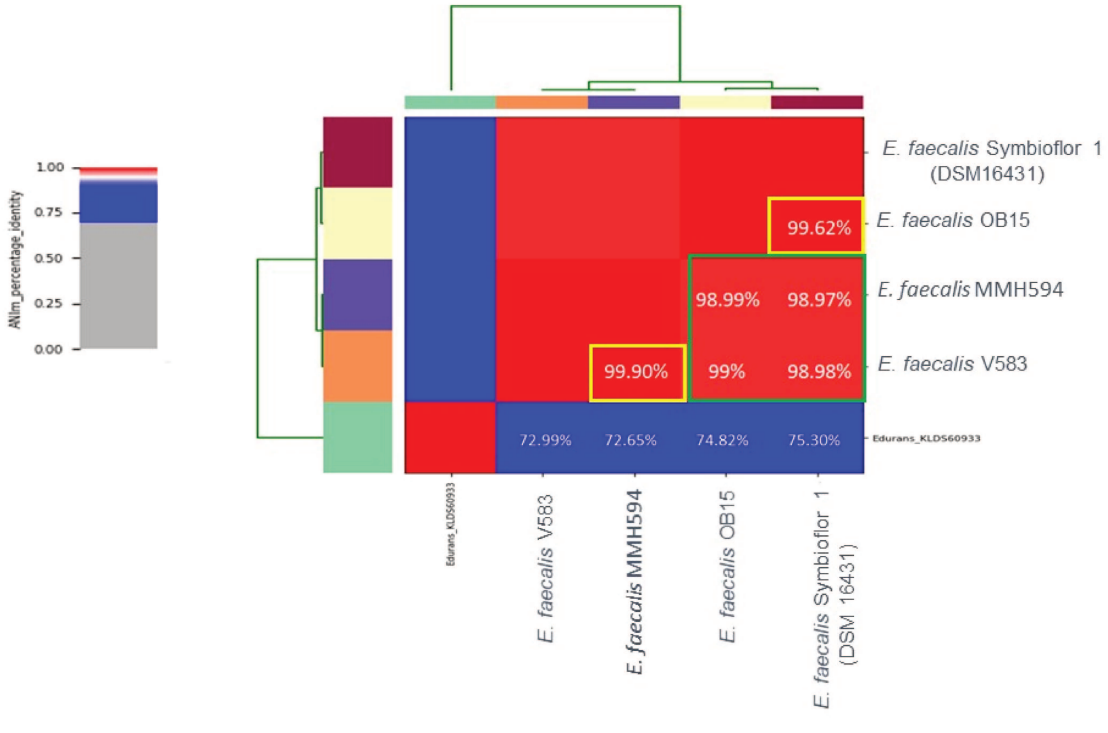


Fig 1.

Figure 2.JPEG

In review

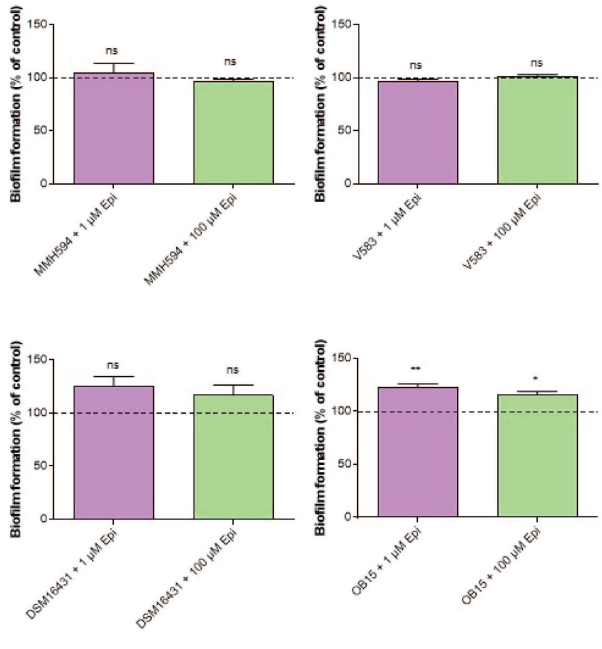


Fig 2A.

Figure 3.JPEG

In review

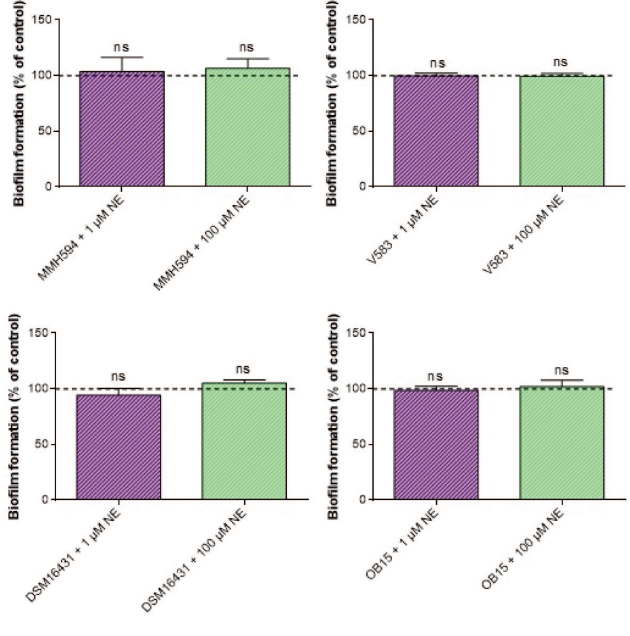
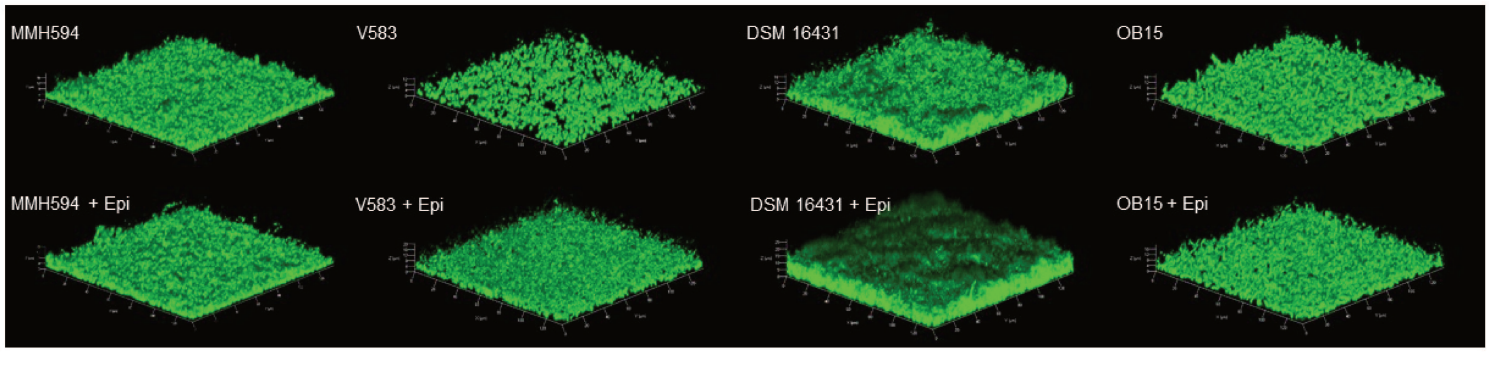


Fig 2B.

Figure 4.JPEG

In review

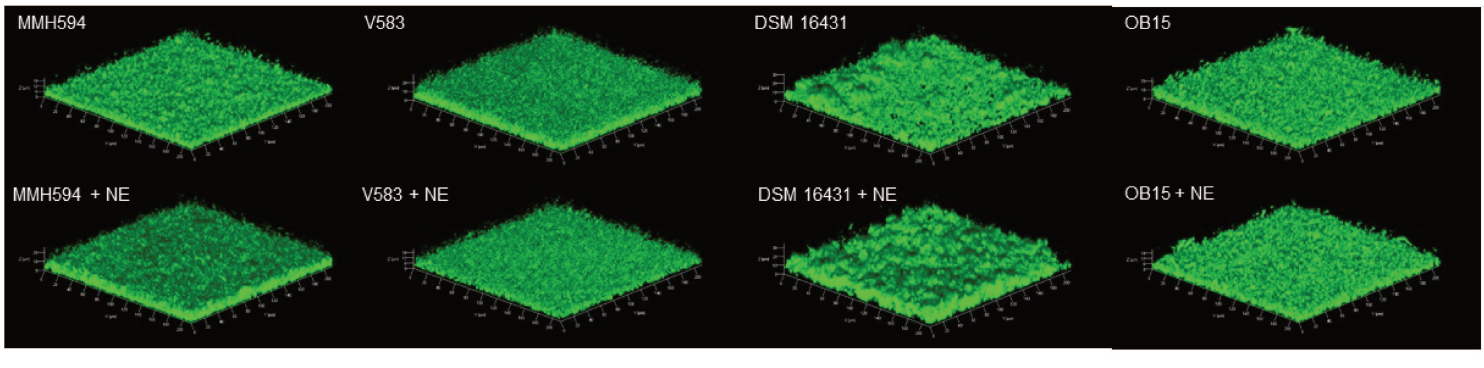


Strains	Biovolume	Average thickness	Maximum thickness
MMH 594 + Epi	154 % (± 22%)	145 % (± 20 %)	118 % (± 6 %)
V583 + Epi	187 % (± 47 %) *	190 % (± 68 %) *	131 % (± 14 %) *
DSM 16431 + Epi	151 % (± 2 %)	139 % (± 3 %) *	114 % (± 2 %) *
OB15 + Epi	125 % (± 3 %) *	127 % (± 6 %) **	110 % (± 3 %) *

Fig 3A.

Figure 5.JPEG

In review



Strains	Biovolume	Average thickness	Maximum thickness
MMH 594 + NE	137 % (± 18%)	127 % (± 12 %)	107 % (± 7 %)
V583 + NE	119 % (± 6 %)	109 % (± 6 %)	98 % (± 5 %)
DSM 16431 + NE	151 % (± 29 %)	143 % (± 25 %)	108 % (± 7 %)
OB15 + NE	127 % (± 29 %)	117 % (± 20 %)	101 % (± 4 %)

Fig 3B.

Figure 6.JPEG

In review

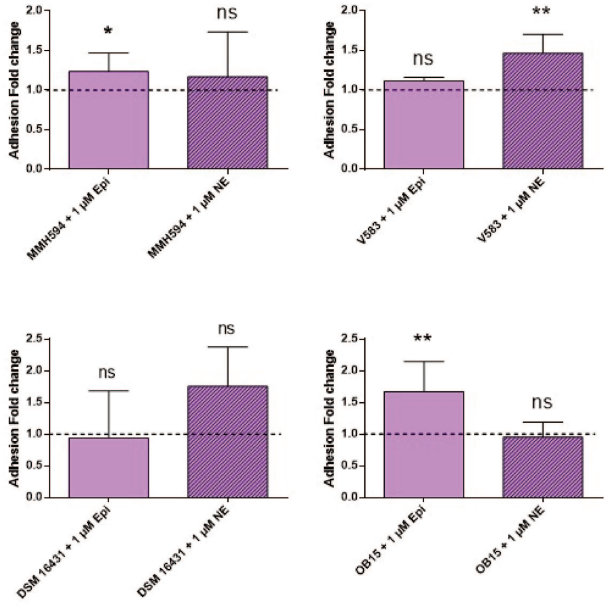


Fig 4.

In review

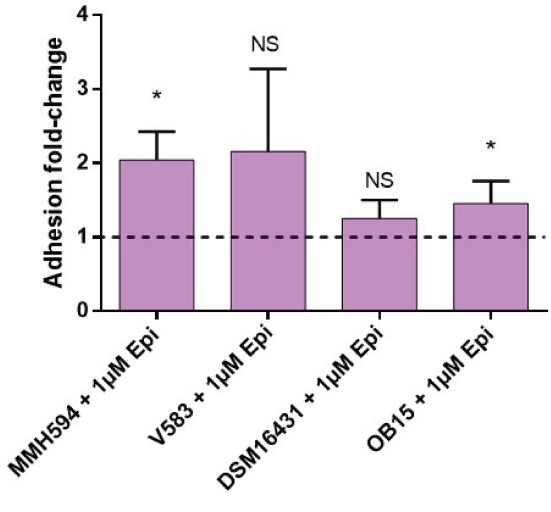


Fig 5.

Figure 8.JPEG

In review

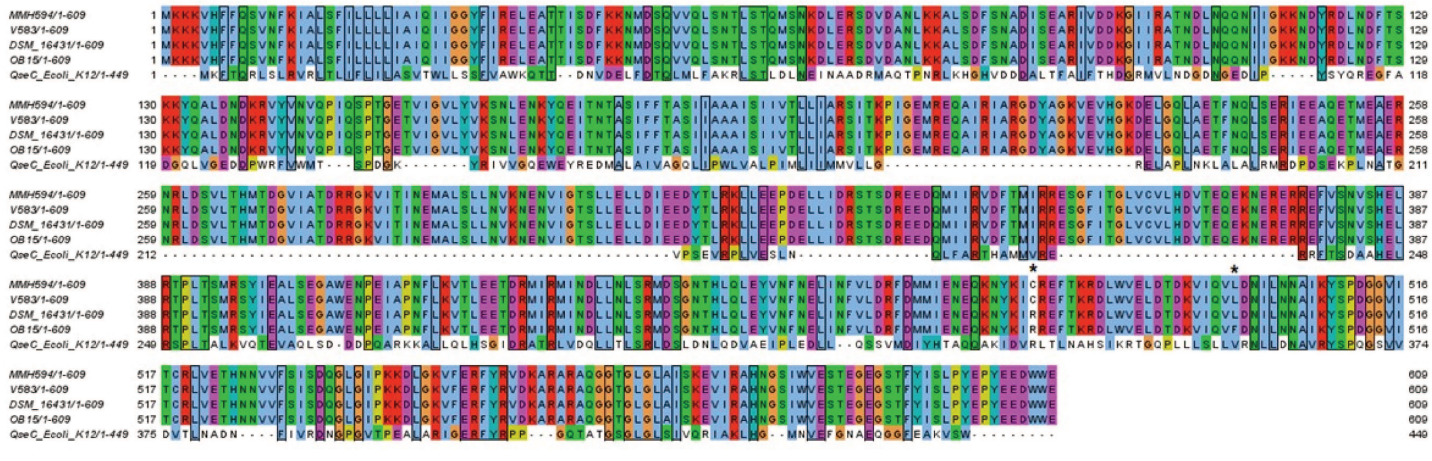


Fig 6.

III. Discussion

Le dialogue entre l'hôte et les microorganismes a été étudié depuis plus de deux décennies, ce qui a amené à la création du domaine de l'endocrinologie microbienne (**Lyte**, 1993). De nombreuses molécules eucaryotes (neurotransmetteurs, hormones peptidiques) peuvent être perçues par les bactéries (**Lesouhaitier et al.**, 2009), parmi ces substances, les effets des catécholamines ont été largement étudiés. Il a été montré que ces molécules pouvaient stimuler la croissance de bactéries pathogènes à Gram négatif comme *E. coli*, *V. cholerae*, *H. pylori*, *S. enterica* et *Y. enterocolitica*, leur virulence et donc l'établissement d'une infection bactérienne (**Sarkodie et al.**, 2019). Les noyaux catéchols sont connus pour avoir un rôle de sidérophore chez les bactéries. Il a été montré que les catécholamines pouvaient servir de xénosidérophores, stimulant la croissance bactérienne en rendant le fer biodisponible dans des milieux carencés (**Kinney et al.**, 2000). Peu d'études ont été réalisées sur des bactéries à Gram positif. Elles ont concernées surtout des Streptocoques (**Freestone et al.**, 1999; **Lyte et al.**, 2003; **Sandrini et al.**, 2014) mais aucune donnée n'était disponible sur les Enterocoques, c'est pourquoi nous avons décidé d'évaluer l'effet des catécholamines sur quatre souches d'*E. faecalis*, deux pathogènes (*E. faecalis* MMH594 (**Huycke et al.**, 1991) et *E. faecalis* V583 (**Sahm et al.**, 1989)) et deux probiotiques (*E. faecalis* OB15 (**Baccouri et al.**, 2019) et *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431 ((**Fritzenwanker et al.**, 2013)). Les résultats obtenus concernant la distance génomique entre ces quatre souches ont montré que comme cela pouvait être attendu, les deux probiotiques étaient plus proches entre eux (99,62%) ainsi que les deux pathogènes (99,9%), que si on comparait les probiotiques avec les pathogènes (98,97-99%). L'effet de l'épinéphrine et de la norépinéphrine sur la formation de biofilm et l'adhésion sur cellules eucaryotes a été étudié chez ces quatre souches. La quantification par la méthode du cristal violet, des biofilms d'*E. faecalis* formés sur des surfaces polystyrène, a montré que l'épinéphrine (1 et 100 µM) ne modulait la formation de biofilm que pour les deux souches d'*E. faecalis* probiotiques, tandis que la norépinéphrine n'avait aucun effet significatif quelle que soit la souche d'*E. faecalis* testée. La quantification des biofilms par cristal violet n'étant pas précise, nous avons décidé par la suite d'étudier la structure des biofilms par MCBL. Trois paramètres ont été mesurés (le biovolume, l'épaisseur moyenne et l'épaisseur maximale). Les résultats ont montré que l'épinéphrine était capable de moduler de

façon significative plusieurs de ces paramètres, que ce soit chez les pathogènes ou les probiotiques. Au contraire, la norépinéphrine a montré moins d'effets modulateurs sur la formation de biofilm par *E. faecalis*. La capacité des catécholamines à augmenter la formation de biofilm bactérien a déjà été observée auparavant chez de nombreuses bactéries à Gram négatif, notamment *E. coli* O157:H7 (**Bansal et al.**, 2007), *V. harveyi* (**Yang et al.**, 2014) et *P. aeruginosa* (**Freestone et al.**, 2012) ou encore *A. hydrophyla* (**Dong et al.**, 2016). Chez les bactéries à Gram positif, peu de données expérimentales sont disponibles, mais il a été montré aussi que les catécholamines stimulent la formation de biofilm chez *S. pneumoniae* (**Sandrini et al.**, 2014), *S. epidermidis* (**Freestone et al.**, 1999; **Lyte et al.**, 2003), et *C. acnes* (**Borrel et al.**, 2019). La croissance de *A. naeslundii* et *A. gerensceriae* était aussi augmentée en présence d'épinéphrine et norépinéphrine (**Roberts et al.**, 2003). Au contraire, dans nos conditions expérimentales, nous avons trouvé que les catécholamines n'ont pas d'effet sur la croissance d'*E. faecalis*. Pour compléter ces résultats, nous avons aussi étudié l'effet des catécholamines sur l'adhésion d'*E. faecalis* sur des cellules eucaryotes. Nous avons pu montrer que l'épinéphrine stimule de façon significative l'adhésion de *E. faecalis* MMH594 et *E. faecalis* OB15 sur les cellules intestinales Caco-2/TC7, tandis que la norépinéphrine n'augmente l'adhésion sur ces cellules que pour *E. faecalis* V583. Sur un modèle de kératinocytes, les cellules HaCaT, l'épinéphrine s'est aussi montrée capable de stimuler l'adhésion d'*E. faecalis* MMH594 et OB15.

Concernant la recherche de senseur, nous avons montré que VicK était homologue à QseC. Chez les quatre souches d'*E. faecalis*, cette séquence est conservée. Cette protéine VicK appartient au système VicKR, aussi connus sous les noms YycGF ou bien WalKR. Ce senseur est également présent chez *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* et serait essentiel à la croissance bactérienne (**Fabret & Hoch**, 1998) ainsi qu'au métabolisme de la paroi cellulaire (**Dubrac & Msadek**, 2004). Ces différents auteurs ont aussi précisé que le système VicKR était spécifique et hautement conservé chez les bactéries à Gram positif possédant un faible % en GC. Chez *E. faecalis* V583, ce senseur semble être indispensable pour la viabilité. En effet, l'étude menée par Hancock & Perego a montré qu'un mutant VicK était non viable pour la bactérie (**Hancock & Perego**, 2004). A ce jour, le signal physiologique ou mécanique activant ce système senseur est inconnu.

Ces résultats ont montré pour la première fois que les catécholamines (épinéphrine et norépinéphrine) pouvaient, non seulement moduler la formation de biofilms et l'adhésion de souches pathogènes, mais également de souches probiotiques. Dans le corps humain, les catécholamines pourraient donc participer à la compétition bactérienne pour la niche écologique, en agissant à la fois sur les pathogènes et les probiotique. Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour évaluer l'effet de ces catécholamines sur des biofilms mixtes.

Chapitre IV : Recherche de senseurs adrénergiques putatifs chez *P. aeruginosa* et *E. faecalis*

I. Introduction

À l'issue des travaux réalisés précédemment lors de cette thèse, sur les deux pathogènes opportunistes *P. aeruginosa* et *E. faecalis,* il est possible de conclure que ces bactéries peuvent adapter leur physiologie (adhésion, formation de biofilm) en présence de l'hormone de stress épinéphrine. Ces résultats suggèrent que *P. aeruginosa* et *E. faecalis* pourraient peut-être posséder un ou plusieurs récepteurs (senseurs) adrénergiques capable de reconnaitre cette molécule, bien qu'aucune étude à ce jour n'a encore mis en évidence de senseur putatif aux catécholamines chez ces deux bactéries. C'est dans ce contexte que nous avons entrepris une recherche *in silico* de senseurs adrénergiques putatifs chez *P. aeruginosa* et *E. faecalis*.

Chez certaines bactéries, notamment *E. coli* et *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, des senseurs ont été décrits comme étant capables de percevoir la présence de catécholamines (épinéphrine/norépinéphrine). Parmi eux, des TCS (décrit §I.A.4) peuvent jouer ce rôle (QseBC, QseEF, BasRS et CpxAR) (**Karavolos et al.**, 2013). Le senseur à catécholamines ayant été le plus étudié est QseBC présent chez *E. coli*, un orthologue de ce senseur a aussi été identifié chez *S. enterica*. Au vu de ces données, la recherche de senseurs adrénergiques putatifs chez *P. aeruginosa* et *E. faecalis* a été effectuée à partir des séquences protéiques de QseC et QseB.

II. Résultats

1. Recherche chez *P. aeruginosa*

Des alignements protéiques ont été réalisés avec le logiciel BlastP. Les résultats de cette recherche ont mis en évidence chez *P. aeruginosa*, la présence de la protéine PmrB possédant un recouvrement de 93% et une identité de 31,51%, comparée à QseC (UniProtKB - Q8X524) d'*E. coli*. Il s'agit de la seule protéine dont le taux de recouvrement était au-dessus de 90%, avec 438 acides aminés alignés sur les 449 présents dans la séquence de QseC [Figure 38].

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
☑	two-component regulator system signal sensor kinase PmrB [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	149	149	93%	3e-40	31.51%	NP_253465.1

two-component regulator system signal sensor kinase PmrB [Pseudomonas aeruginosa PAO1]

Sequence ID: NP_253465.1 **Length:** 477 **Number of Matches:** 1

See 4 more title(s)

Range 1: 8 to 434 GenPept Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
149 bits(375)	3e-40	Compositional matrix adjust.	138/438(32%)	231/438(52%)	27/438(6%)

```
Query  8    SLRVRLTLIFLILASVTWLLSSFVAWKQTTDNVDELFDTQLMLFAKR-LSTLDLNEINAA  66
            S+R RL +  L+   + WL  + + +  +   V+ LFD  ++ F +  L  LDL   + A
Sbjct  8    SVRRRLLVNLLVGFVLCWLSVAALTYHLSLKQVNRLFDDDMVDFGEAALRLLDLATEDQA  67

Query  67   DRMAQTPNKLKHGHVD---------DDALTFAIFTHDGRMVLNDGDNGEDIPYSYQREGF  117
                     ++              + AL +A++  DG+ +L+  +   +I  + Q  GF
Sbjct  68   GEDGSITEIIERSREAIQGLPLLRRESALGYALW-RDGQPLLSSLNLPPEI--TAQGPGF  124

Query  118  ADGQLVGDKDQWRFVWMTSPDGKYRIVVGQEWEYREDMALAIVAGQLIPWLVALPVMLII  177
            +  +  G    WR + +   DG ++I + +   YR+     ++   L P L+ALP++  +
Sbjct  125  STVEAQGT--HWRVLQLNI-DG-FQIWISENLIYRQHTMNLLLFYSLFPLLLALPLLGGL  180

Query  178  MMVLLGRELAPLNKLALALRMRDPDSEKPLNATGVPSEVRPLVESLNQLFARTHAMMVRE  237
            +   + R LAPL ++   ++ R     +P+    VP E+R L++ LN L  R    +  E
Sbjct  181  VWFGVARGLAPLREVQAEVQQRSARHLQPIAVEAVPLEIRGLIDELNLLLERLRTALEAE  240

Query  238  RRFTSDAAHELRSPLTALKVQTEVAQLSDDDPQARKKALLQLHSGIDRATRLVDQLLTLS  297
            RR TSDAAHE+R+PL +L+   +VA L  +DP+A  + LLQ+   ++R + L++Q+L L+
Sbjct  241  RRLTSDAAHEIRTPLASLRTHAQVA-LRSEDPKAHARGLLQVSRSVERISTLMEQILLLA  299

Query  298  RLDSLDNLQDVAEIPLEDLLQSSVMDIYHTAQQA-KIDVRLTLNVQGIKRTGQPLLLSLL  356
            RLD    L+    + L  L +  + ++   A+QA   D+ L+L+ + +   G  L L  +
Sbjct  300  RLDGDALLEQFHPVNLATLAEDVLSEL---ARQAIDKDIELSLHQETVYVMGIDLWLKAM  356

Query  357  VRNLLDNAVRYSPQGSVVDVTLN--ADNFI--VRDNGPGVTPEALARIGERFYRPPGQTA  412
            V NL+ NA+RY+P G  V++ +   A + +  VRDNGPGV  E    I  RFYR P  ++
Sbjct  357  VGNLVGNALRYTPAGGQVEIRVENRAQHAVLRVRDNGPGVALEEQQAIFTRFYRSPATSS  416

Query  413  -TGSGLGLSIVQRIAKLH  429
              GSGLGL IV+RI +LH
Sbjct  417  GEGSGLGLPIVKRIVELH  434
```

Figure 38. Alignement des séquences de QseC (UniProtKB - Q8X524) d'*E.coli* et PmrB (UniProtKB - Q9HV31) de *P. aeruginosa*, réalisé par le logiciel BlastP

De même, une recherche d'homologie de séquence de QseB (UniProtKB - Q8XBS3) a été effectuée chez *P. aeruginosa* et les résultats indiquent que PmrA semblerait être l'homologue de cette protéine, avec un recouvrement de 99% et une identité de 53,21% [Figure 39]. PmrA est le régulateur de réponse associé à PmrB, senseur du TCS PmrAB.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
two-component regulator system response regulator PmrA [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	228	228	99%	1e-76	53.21%	NP_253464.1

two-component regulator system response regulator PmrA [Pseudomonas aeruginosa PAO1]

Sequence ID: NP_253464.1 **Length:** 221 **Number of Matches:** 1

See 5 more title(s)

Range 1: 1 to 218 GenPept Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
228 bits(581)	1e-76	Compositional matrix adjust.	116/218(53%)	151/218(69%)	0/218(0%)

```
Query  1    MRILLIEDDMLIGDGIKTGLSKMGFSVDWFTQGRQGKEALYSAPYDAVILDLTLPGMDGR  60
            MRILL EDD+L+GDGI+ GL   G +V+W T G   + AL +  +D ++LD+ LP   G
Sbjct  1    MRILLAEDDLLLGDGIRAGLRLEGDTVEWVTDGVAAENALVTDEFDLLVLDIGLPRRSGL  60

Query  61   DILREWREKGQREPVLILTARDALEERVEGLRLGADDYLCKPFALIEVAARLEALMRRTN  120
            DILR  R +G   PVL+LTARD + +RV GL  GADDYL KPF L E+ AR+ AL RRT
Sbjct  61   DILRNLRHQGLLTPVLLLTARDKVADRVAGLDSGADDYLTKPFDLDELQARVRALTRRTT  120

Query  121  GQASNELRHGNVMLDPGKRIATLAGEPLTLKPKEFALLELLMRNAGRVLPRKLIEEKLYT  180
            G+A  +L HG + LDP     TL+G+ + L P+E+ALL LL+ N+G+VL R  +E+ LY
Sbjct  121  GRALPQLVHGELRLDPATHQVTLSGQAVELAPREYALLRLLLENSGKVLSRNQLEQSLYG  180

Query  181  WDEEVTSNAVEVHVHHLRRKLGSDFIRTVHGIGYTLGE  218
            W  +V SNA+EVHVHHLRRKLG+  IRTV GIGY + +
Sbjct  181  WSGDVESNAIEVHVHHLRRKLGNQLIRTVRGIGYGIDQ  218
```

Figure 39. Alignement des séquences de QseB (UniProtKB - Q8XBS3) d'*E. coli* et PmrA (UniProtKB - Q9HV32) de *P. aeruginosa*, réalisé avec le logiciel BlastP

Des homologues protéiques ont également été recherchés à partir des séquences des autres senseurs adrénergiques dits alternatifs, QseEF, BasRS et CpxAR, cités précédemment. Les résultats sont présentés dans le [Tableau 15].

Tableau 15. Recherche d'homologues protéiques des récepteurs alternatifs (QseEF, BasRS et CpxAR) chez *P. aeruginosa,* avec BlastP

Senseur	Régulateur de réponse	Nom de la protéine homologue	Recouvrement	Identité
QseE (UniProtKB - Q8XA47)		SagS (PA2824)	46%	33,93%
BasS (UniProtKB - P36557)		PmrB (PA4777)	70%	32,83%
CpxA (UniProtKB - Q8XG60)		ParS (PA1798)	62%	31,16%
	QseF (UniProtKB - P0AFU5)	PilR (PA4547)	83%	43,05%
	BasR (UniProtKB - P36556)	PmrA (PA4776)	96%	44,86%
	CpxR (UniProtKB - Q8Z2W2)	CpxR (PA3204)	97%	48,25%

Le système PmrAB, en plus d'être homologue au système QseBC, bien décrit chez *E. coli* pour son rôle comme senseur de catécholamines, est également homologue au TCS BasRS, nous nous sommes donc focalisés pour la suite des analyses *in silico* sur le système PmrAB.

En parallèle, nous avons aussi recherché chez des bactéries possédant un système QseBC, l'environnement génomique dans lequel se situent les gènes de ce TCS. Un gène nommé *ygiW* est situé en amont de *qseBC* (**Weigel & Demuth**, 2016). Ce gène code pour une protéine localisée au niveau périplasmique, appartenant à la famille des protéines *OB-Fold family* possédant un domaine de liaison avec des oligonucléotides ou oligosaccharides. Il a été montré, chez des bactéries ayant un homologue de QseC, comme *K. pneumoniae* ou *H. influenzae*, que ce gène pouvait être soit co-transcrit avec *qseBC*, soit transcrit sur le brin opposé à *qseBC*, soit être très éloigné de *qseBC* sur le génome, ou parfois même être totalement absent [Figure 40] (**Weigel & Demuth**, 2016).

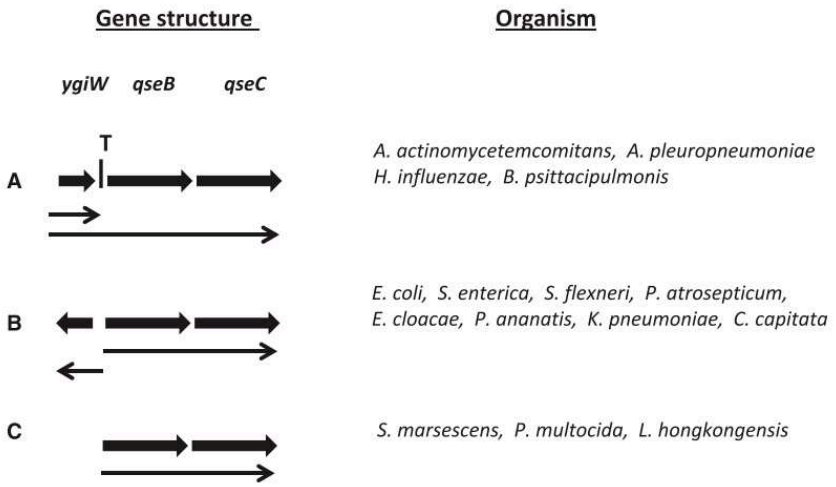


Figure 40. Organisation génomique de *qseBC* (**Weigel & Demuth**, 2016)

Chez *P. aeruginosa*, une recherche du gène *ygiW* a été réalisée. Nommé *carO* (PA0320) chez *P. aeruginosa*, ce gène serait impliqué dans l'homéostasie du calcium (**Guragain et al.**, 2016). Il est situé sur une partie du génome très éloignée de *pmrAB* [Figure 41] comme cela peut être le cas chez d'autres bactéries.

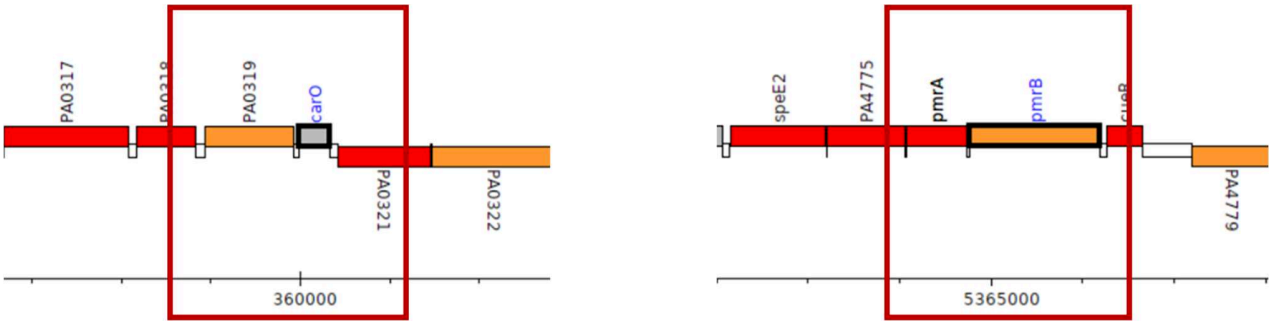


Figure 41. Localisation de *pmrAB* et *carO* (*ygiW,* PA0320*)* chez *P. aeruginosa* (Pseudomonas.com)

Une analyse *in silico* de la séquence de PmrB révèle la présence de domaines spécifiques aux senseurs bactériens, similaires à ceux présents chez QseC, un domaine histidine kinase, un domaine ATPase et un domaine HAMP [Figure 42].

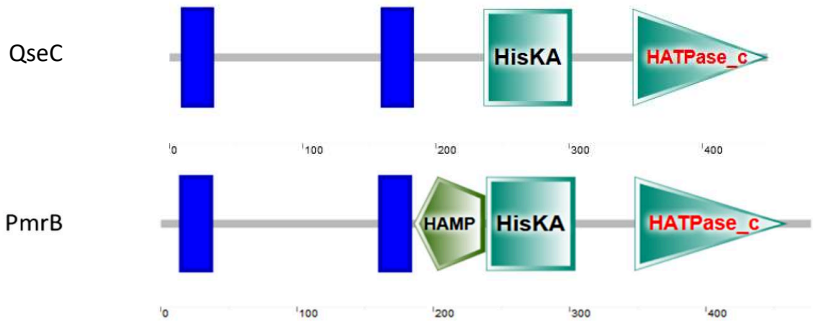


Figure 42. Représentation de l'organisation des domaines protéiques de QseC d'*E. coli* et PmrB chez *P. aeruginosa* (SMART database)

Ces deux senseurs possèdent un domaine périplasmique contenu entre les résidus 34 à 161 pour PmrB et les résidus 37 à 155 pour QseC. D'après l'étude menée par Weigel & Demuth (**Weigel & Demuth**, 2016) sur le domaine périplasmique de QseC d'un grand nombre de bactéries, il

existerait un motif signal qui permettrait, chez certaines d'entre elles, d'initier la liaison avec la molécule signal, le complexe épinéphrine-fer chez *A. actinomycetemcomitans* ou le fer chez *H. influenzae*. Un alignement de la séquence périplasmique de PmrB avec celle de QseC a donc été réalisé [Figure 43].

```
QseC   ---TDNVDELFDTQLMLFAK-RLSTLDLNEINAADRMAQTPNKLKHGHV---------DD
Pmr    HLSLKQVNRLFDDDMVDFGEAALRLLDLATEDQAGEDGSITEIIERSREAIQGLPLLRRE

QseC   DALTFAIFTHDGRMVLNDGDNGEDIPYSYQREGFADGQLVGDKDQWRFVWMTSPDGKYRI
Pmr    SALGYALW-RDGQPLLSSLNLPPEI--TAQGPGFSTVEAQGT--HWRVLQLNI-DG-FQI

QseC   VVGQEWEYREDM----
Pmr    WISENLIYRQHTMNLL
```

Figure 43. Alignement des séquences périplasmiques de QseC d'*E. coli* et PmrB de *P. aeruginosa* (encadré en rouge, le motif de reconnaissance du signal, en bleu les résidus en commun)

Le motif signal consensus est encadré en rouge sur la séquence de QseC d'*E.coli*. Sur les cinq résidus (glutamate-tyrosine-arginine-glutamate-aspartate) composant le plus souvent ce motif, la séquence PmrB de *P. aeruginosa* en possède trois (-YRQ-). En effet, ici l'acide glutamique (E) est remplacé par la glutamine (Q) comme cela est aussi le cas par exemple chez *Pectobacterium atrosepticum*.

Afin de voir si ce senseur d'intérêt serait capable de lier l'épinéphrine, une analyse de docking moléculaire a été réalisée. Pour cela, une structure tridimensionnelle du senseur est essentielle, or celle de PmrB n'était pas disponible dans les bases de données. Un logiciel nous permettant de prédire la structure tridimensionnelle de la protéine a donc été utilisé (I-TASSER), [Figure 44].

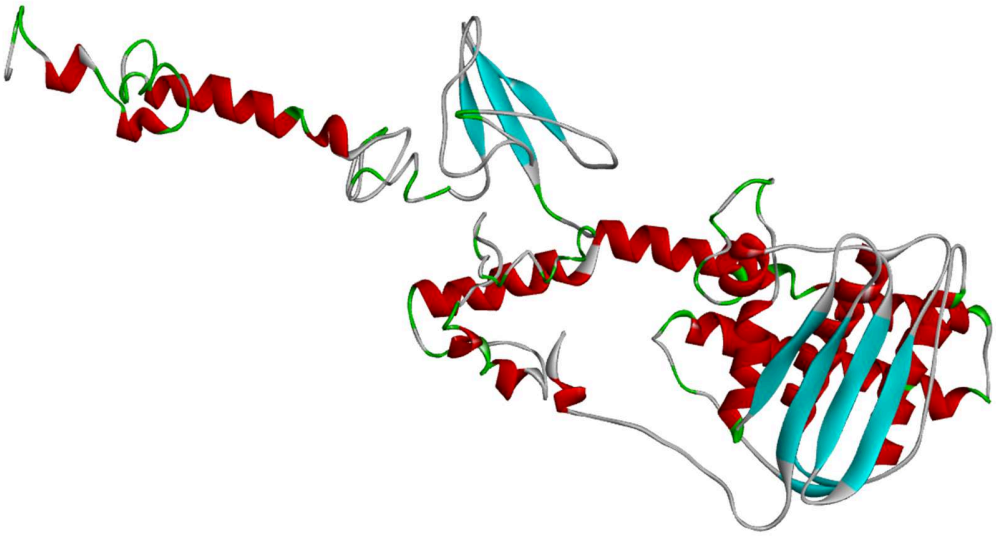


Figure 44. Structure prédictive de PmrB chez *P. aeruginosa*
(réalisée avec le logiciel I-TASSER, en rouge les hélices et en bleu les feuillets)

L'interaction qui pourrait exister entre PmrB de *P. aeruginosa* et l'épinéphrine a été étudiée grâce aux logiciels AutoDock et Vina. La représentation schématique des interactions possibles est visible sur la [Figure 45].

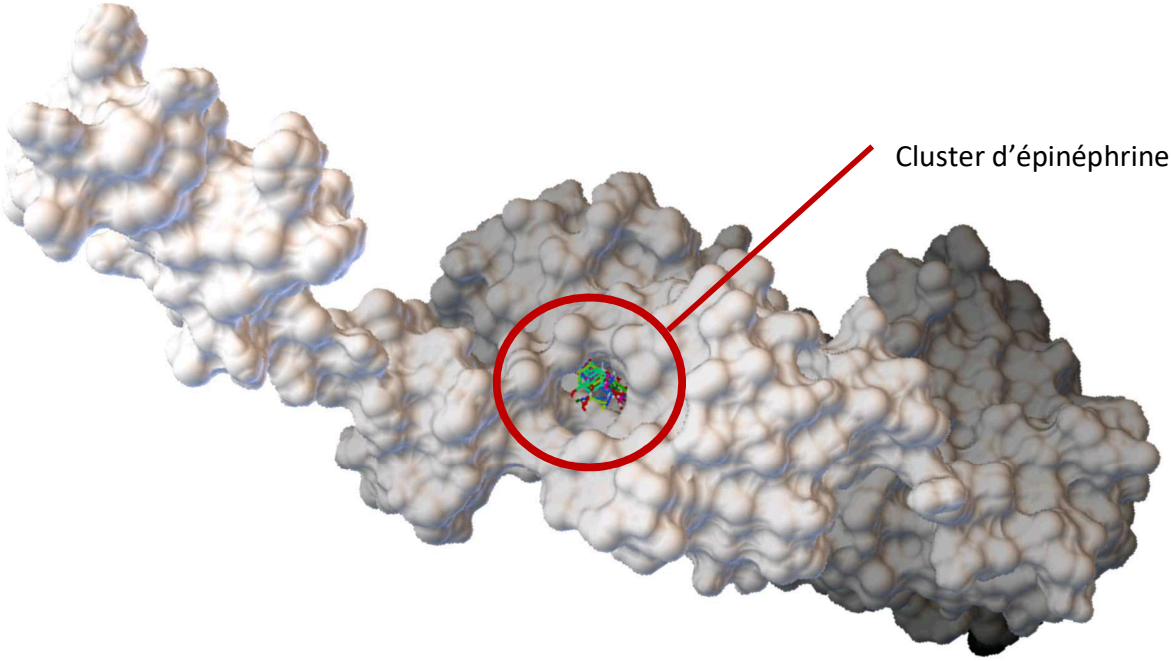


Figure 45. Modélisation des interactions entre l'épinéphrine et PmrB de *P.aeruginosa*. Images obtenues à partir du logiciel AutoDock Tools.

Résultats

Les résultats de docking moléculaire ont permis de montrer qu'un cluster d'épinéphrine (ensemble de molécules d'épinéphrine dont l'interaction est prédite sur une même zone) pourrait se fixer au niveau de la partie périplasmique de PmrB de *P. aeruginosa*, dans une poche, avec des énergies de liaisons allant de -5,9 à -4,6 kcal/mol. Aucune donnée disponible dans la littérature scientifique sur des ligands naturels de PmrB de *P. aeruginosa* ne permet de comparer ces résultats. De plus, la modélisation de PmrB reste prédictive, des analyses complémentaires seront donc nécessaires.

Le senseur d'un TCS se trouvant au niveau de la membrane interne chez les bactéries à Gram négatif, l'épinéphrine doit dans un premier temps pouvoir franchir la membrane externe. Les résultats obtenus en milieu sérum-SAPI laissent suggérer que l'épinéphrine pourrait se complexer au fer et être acheminée ainsi vers le périplasme de la bactérie par un transporteur. La croissance du mutant PAO1 Δ*pvdDpchEFΔfpvA* n'ayant pas été stimulée en milieu sérum-SAPI, supplémenté en épinéphrine, dû peut-être à un défaut de transport de la molécule, il nous a semblé intéressant d'étudier les interactions possibles entre le transporteur FpvA et l'épinéphrine complexée au fer.

Dans l'étude de Sandrini et al., il a été montré que les catécholamines pouvaient récupérer le fer des complexes transferrines-fer et que cette molécule de fer était par la suite internalisée au sein de la bactérie. Ils ont supposé que ces catécholamines pouvaient avoir un rôle de pseudosidérophore. Ils ont proposé une structure chimique hypothétique la plus stable possible pour lequel la norépinéphrine pourrait fixer le fer. Cette structure a montré des similarités de structure géométrique avec le complexe entérobactine-fer [Figure 46] (**Sandrini et al.**, 2010), nous avons également modélisé la structure possible d'un complexe épinéphrine-fer [Figure 47].

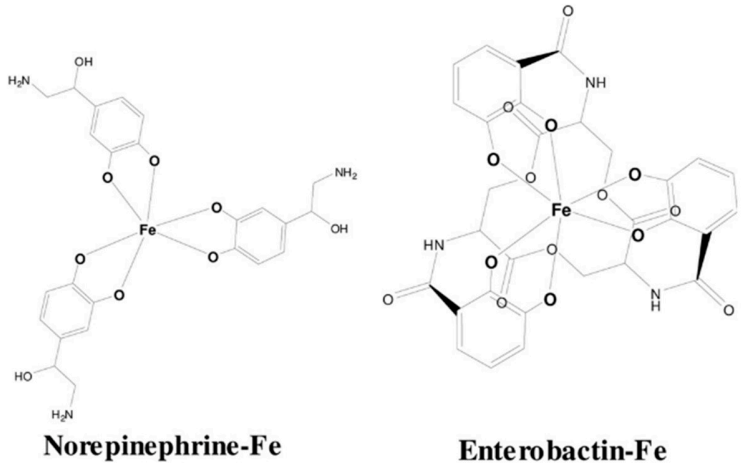


Figure 46. Modélisation des complexes norépinéphrine-Fe et entérobactine-Fe (**Sandrini et al.**, 2010)

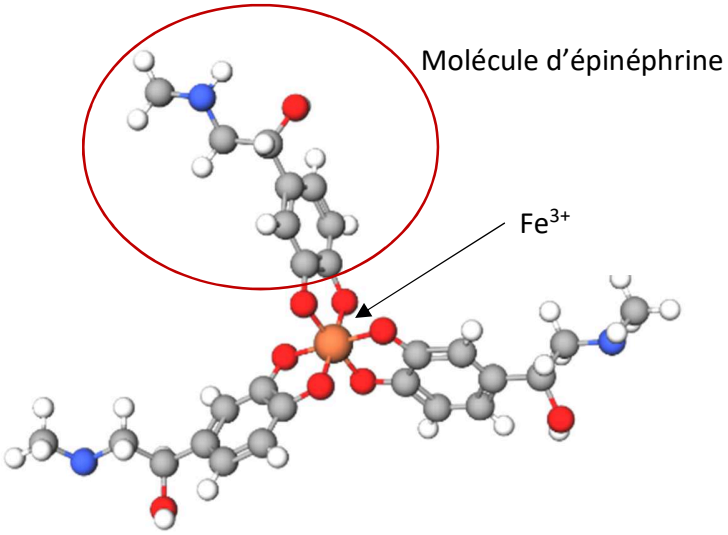
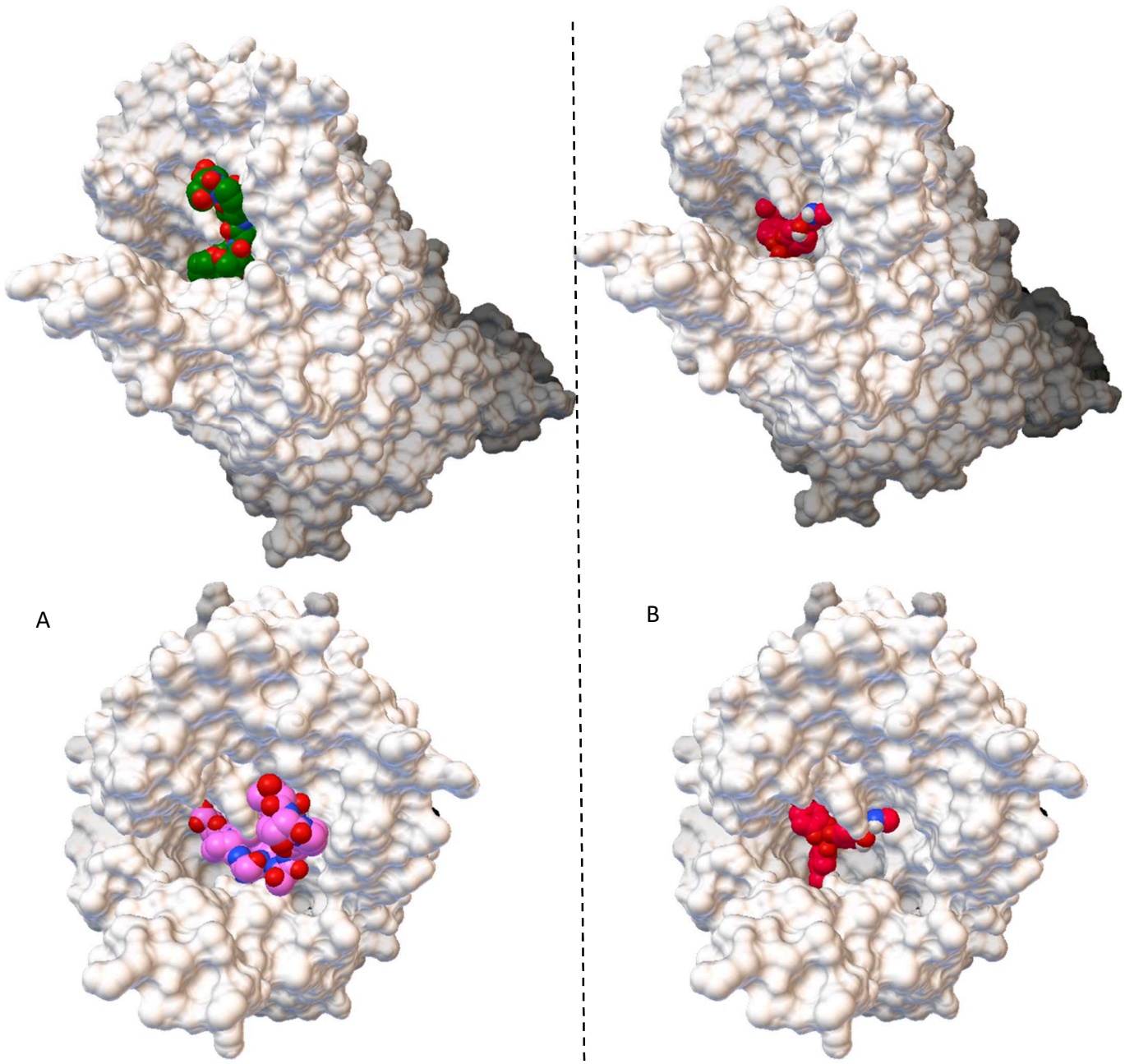


Figure 47. Modélisation du complexe épinéphrine-fer

Cette structure a été réalisée à l'aide de l'outil en ligne Molview (http://molview.org/)

Les interactions possibles entre le transporteur FpvA et le complexe épinéphrine-fer ont été analysées par docking moléculaire [Figure 48, 49] et comparées à celles obtenues avec le ligand naturel de FpvA : la ferripyoverdine (Fe-Pvd) [Figure 50] (**Schalk et al.**, 2009).



FpvA - ferripyoverdine

FpvA – épinéphrine-fer

Figure 48. Modélisations de la structure de FpvA liée avec la ferripyoverdine (gauche) et avec le complexe épinéphrine-fer (droite). (Images obtenues à partir du logiciel AutoDock Tools. Les modélisations du bas notées A et B sont des vues du dessus du transporteur.)

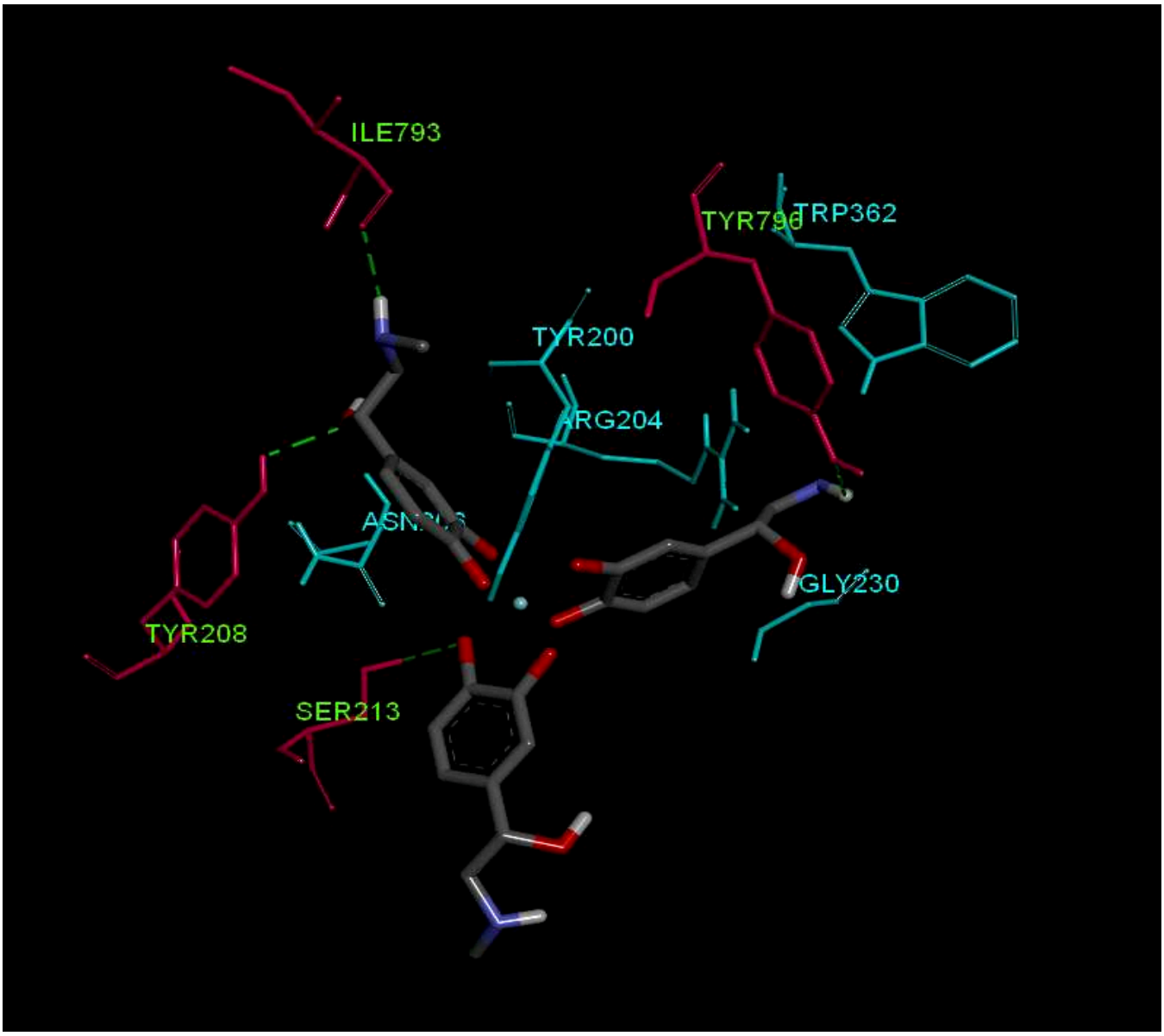


Figure 49. Interactions entre FpvA et le complexe épinéphrine-fer (Réalisée par Discovery Studio, en rose les acides aminés de FpvA qui pourraient être impliqués dans l'interaction avec le complexe épinéphrine-fer via des liaisons hydrogène (≤2,5 Å))

L'énergie de liaison pour le modèle représenté ici est de -7,1 kcal/mol. La [Figure 49] nous montre que le complexe épinéphrine-fer possèderait neuf sites d'interactions avec la protéine FpvA.

Parmi ces neuf sites d'interactions, quatre seraient des liaisons hydrogènes (acides aminés représentés en rose et écrits en vert sur la [Figure 49]) et sept acides aminés sont en communs avec ceux impliqués dans la liaison entre FpvA et le ligand naturel la ferripyoverdine, à savoir TYR 200, ARG 204, ASN 206, SER 213, GLY 230, TRP 362 et TYR 796 [Figure 50].

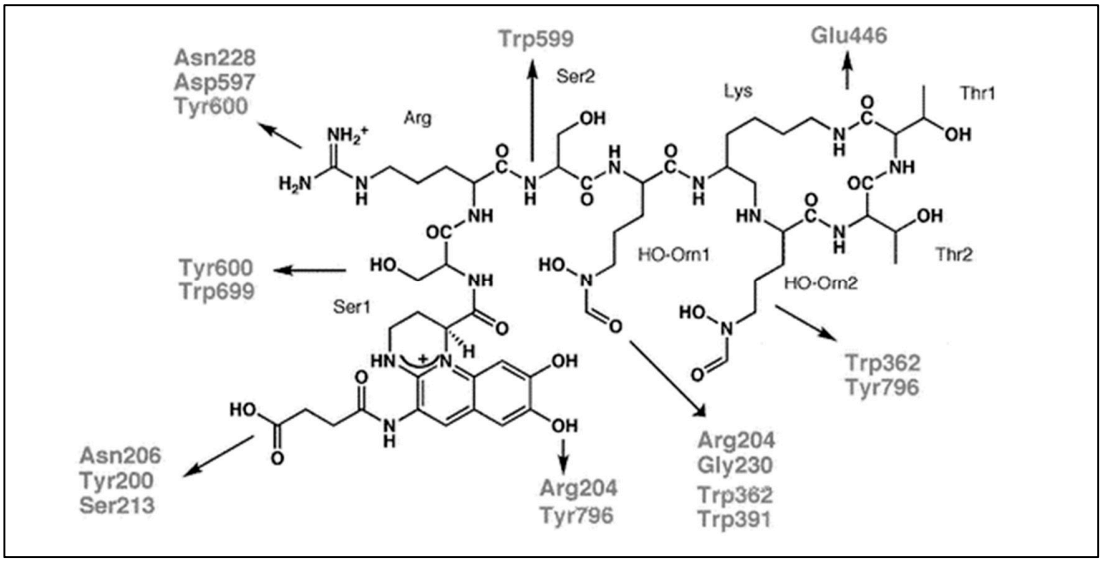


Figure 50. Interactions entre le transporteur FpvA et le complexe ferripyoverdine d'après (**Schalk et al.**, 2009)

Des études d'interactions avec d'autres transporteurs (FptA, PirA et PfeA) ont aussi été réalisées, mais aucune n'a présenté de résultats pertinents (valeurs d'énergie de liaisons élevées). Au vu des résultats des analyses de docking réalisé chez *P. aeruginosa*, c'est donc le transporteur FpvA qui semblerait intéressant pour des perspectives de poursuite de ces travaux de recherche.

2. Recherche chez *E. faecalis*

L'alignement de la séquence protéique du senseur kinase QseC d'*E. coli*, reconnaissant l'épinéphrine et la norépinéphrine, avec les bases de données protéiques d'*E. faecalis* montre une similarité de séquences avec la protéine VicK aussi appelée WalK chez certaines bactéries dont *E. faecalis* MMH594 [Figure 51].

PAS domain S-box protein [Enterococcus faecalis EnGen0310 = MMH594]

Sequence ID: EOI80857.1 **Length:** 609 **Number of Matches:** 1

Range 1: 374 to 591 GenPept Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
81.3 bits(199)	2e-17	Compositional matrix adjust.	64/220(29%)	111/220(50%)	15/220(6%)

```
Query  236  RERR-FTSDAAHELRSPLTALKVQTE-VAQLSDDDPQARKKALLQLHSGIDRATRLVDQL  293
            RERR F S+ +HELR+PLT+++   E +++ + ++P+     L       DR  R+++ L
Sbjct  374  RERREFVSNVSHELRTPLTSMRSYIEALSEGAWENPEIAPNFLKVTLEETDRMIRMINDL  433

Query  294  LTLSRLDSLDNLQDVAEIPLEDLLQSSV----MDIYHTAQQAKIDVRLTLNVQGIKRTGQ  349
            L LSR+DS +    +  +   +L+   +    M I +  +  KI    T     ++
Sbjct  434  LNLSRMDSGNTHLQLEYVNFNELINFVLDRFDMMIENEQKNYKICREFTKRDLWVELDTD  493

Query  350  PLLLSLLVRNLLDNAVRYSPQGSVVDVTL----NADNFIVRDNGPGVTPEALARIGERFY  405
             ++  L   N+L+NA++YSP G V+   L    N   F + D G G+  + L ++ ERFY
Sbjct  494  KVIQVL--DNILNNAIKYSPDGGVITCRLVETHNNVVFSISDQGLGIPKKDLGKVFERFY  551

Query  406  RPPGQTAT---GSGLGLSIVQRIAKLHGMNVEFGNAEQGG  442
            R     A    G+GLGL+I + + + H  ++   + E  G
Sbjct  552  RVDKARARAQGGTGLGLAISKEVIRAHNGSIWVESTEGEG  591
```

Figure 51. Alignement des séquences protéiques de QseC d'*E.coli* (UniProtKB - Q8X524) et VicK d'*E. faecalis* MMH594 réalisé par le logiciel BlastP

Avec un recouvrement de 46% et une identité de 29%, le candidat senseur potentiel de l'épinéphrine/norépinéphrine chez *E. faecalis* pourrait donc être VicK. Cette protéine fait partie du TCS VicKR, connu aussi dans la littérature sous le nom de YycGF ou WalKR. Ce TCS existe également chez d'autres bactéries à Gram positif, il a été décrit par exemple comme essentiel à la croissance de *B. subtilis* et au métabolisme de la paroi bactérienne chez *S. aureus* (**Dubrac & Msadek**, 2004; **Fabret & Hoch**, 1998).

La séquence protéique de VicK a été alignée chez les quatre souches d'*E. faecalis* utilisées lors de la thèse, les deux souches pathogènes *E. faecalis* MMH594 et *E. faecalis* V583, ainsi que les deux souches probiotiques *E. faecalis* Symbioflor 1 et *E. faecalis* OB15 (cf. Résultats, chapitre III). Les résultats de cet alignement multiple montrent que la séquence protéique de VicK est très conservée chez ces souches d'*E. faecalis* [Figure 52].

```
MMH594/1-609    1 MKKKVHFFQSVNFKIALSFILLLLIAIQIIGGYFIRELEATTISDFKKNMDSQVVQLSNTLSTQMSNKDLERSDVDANLKKALSDFSNADISEARIVDDKGIIRATNDLNQQNIIGKKNDYRDLNDFTSKKYQ 133
V583/1-609      1 MKKKVHFFQSVNFKIALSFILLLLIAIQIIGGYFIRELEATTISDFKKNMDSQVVQLSNTLSTQMSNKDLERSDVDANLKKALSDFSNADISEARIVDDKGIIRATNDLNQQNIIGKKNDYRDLNDFTSKKYQ 133
Sym 1/1-609     1 MKKKVHFFQSVNFKIALSFILLLLIAIQIIGGYFIRELEATTISDFKKNMDSQVVQLSNTLSTQMSNKDLERSDVDANLKKALSDFSNADISEARIVDDKGIIRATNDLNQQNIIGKKNDYRDLNDFTSKKYQ 133
OB15/1-609      1 MKKKVHFFQSVNFKIALSFILLLLIAIQIIGGYFIRELEATTISDFKKNMDSQVVQLSNTLSTQMSNKDLERSDVDANLKKALSDFSNADISEARIVDDKGIIRATNDLNQQNIIGKKNDYRDLNDFTSKKYQ 133

MMH594/1-609  134 ALDNDKRVYVNVQPIQSPTGETVIGVLYVKSNLENKYQEITNTASIFFTASIIAAAISIIVTLLIARSITKPIGEMREQAIRIARGDYAGKVEVHGKDELGQLAETFNQLSERIEEAQETMEAERNRLDSVLT 266
V583/1-609    134 ALDNDKRVYVNVQPIQSPTGETVIGVLYVKSNLENKYQEITNTASIFFTASIIAAAISIIVTLLIARSITKPIGEMREQAIRIARGDYAGKVEVHGKDELGQLAETFNQLSERIEEAQETMEAERNRLDSVLT 266
Sym 1/1-609    134 ALDNDKRVYVNVQPIQSPTGETVIGVLYVKSNLENKYQEITNTASIFFTASIIAAAISIIVTLLIARSITKPIGEMREQAIRIARGDYAGKVEVHGKDELGQLAETFNQLSERIEEAQETMEAERNRLDSVLT 266
OB15/1-609    134 ALDNDKRVYVNVQPIQSPTGETVIGVLYVKSNLENKYQEITNTASIFFTASIIAAAISIIVTLLIARSITKPIGEMREQAIRIARGDYAGKVEVHGKDELGQLAETFNQLSERIEEAQETMEAERNRLDSVLT 266

MMH594/1-609  267 HMTDGVIATDRRGKVITINEMALSLLNVKNENVIGTSLLELLDIEEDYTLRKLLEEPDELLIDRSTSDREEDQMIIRVDFTMIRRESGFITGLVCVLHDVTEQEKNERERREFVSNVSHELRTPLTSMRSYIE 399
V583/1-609    267 HMTDGVIATDRRGKVITINEMALSLLNVKNENVIGTSLLELLDIEEDYTLRKLLEEPDELLIDRSTSDREEDQMIIRVDFTMIRRESGFITGLVCVLHDVTEQEKNERERREFVSNVSHELRTPLTSMRSYIE 399
Sym 1/1-609    267 HMTDGVIATDRRGKVITINEMALSLLNVKNENVIGTSLLELLDIEEDYTLRKLLEEPDELLIDRSTSDREEDQMIIRVDFTMIRRESGFITGLVCVLHDVTEQEKNERERREFVSNVSHELRTPLTSMRSYIE 399
OB15/1-609    267 HMTDGVIATDRRGKVITINEMALSLLNVKNENVIGTSLLELLDIEEDYTLRKLLEEPDELLIDRSTSDREEDQMIIRVDFTMIRRESGFITGLVCVLHDVTEQEKNERERREFVSNVSHELRTPLTSMRSYIE 399

MMH594/1-609  400 ALSEGAWENPEIAPNFLKVTLEETDRMIRMINDLLNLSRMDSGNTHLQLEYVNFNELINFVLDRFDMMIENEQKNYKICREFTKRDLWVELDTDKVIQVLDNILNNAIKYSPDGGVITCRLVETHNNVVFSIS 532
V583/1-609    400 ALSEGAWENPEIAPNFLKVTLEETDRMIRMINDLLNLSRMDSGNTHLQLEYVNFNELINFVLDRFDMMIENEQKNYKICREFTKRDLWVELDTDKVIQVLDNILNNAIKYSPDGGVITCRLVETHNNVVFSIS 532
Sym 1/1-609    400 ALSEGAWENPEIAPNFLKVTLEETDRMIRMINDLLNLSRMDSGNTHLQLEYVNFNELINFVLDRFDMMIENEQKNYKIRREFTKRDLWVELDTDKVIQVLDNILNNAIKYSPDGGVITCRLVETHNNVVFSIS 532
OB15/1-609    400 ALSEGAWENPEIAPNFLKVTLEETDRMIRMINDLLNLSRMDSGNTHLQLEYVNFNELINFVLDRFDMMIENEQKNYKIRREFTKRDLWVELDTDKVIQVEDNILNNAIKYSPDGGVITCRLVETHNNVVFSIS 532

MMH594/1-609  533 DQGLGIPKKDLGKVFERFYRVDKARARAQGGTGLGLAISKEVIRAHNGSIWVESTEGEGSTFYISLPYEPYEEDWWE 609
V583/1-609    533 DQGLGIPKKDLGKVFERFYRVDKARARAQGGTGLGLAISKEVIRAHNGSIWVESTEGEGSTFYISLPYEPYEEDWWE 609
Sym 1/1-609    533 DQGLGIPKKDLGKVFERFYRVDKARARAQGGTGLGLAISKEVIRAHNGSIWVESTEGEGSTFYISLPYEPYEEDWWE 609
OB15/1-609    533 DQGLGIPKKDLGKVFERFYRVDKARARAQGGTGLGLAISKEVIRAHNGSIWVESTEGEGSTFYISLPYEPYEEDWWE 609
```

Figure 52. Alignement multiple des séquences VicK des quatre souches d'*E. faecalis* utilisées lors de la thèse

Les séquences protéiques de VicK de chacune des souches d'*E. faecalis*, MMH594, V583, Symbioflor 1 DSM 16431 et OB15, étant très similaires, les domaines constituant ce senseur ont été recherchés [Figure 53] et comparés à ceux décrits précédemment pour le senseur QseC d'*E. coli* (page 145).

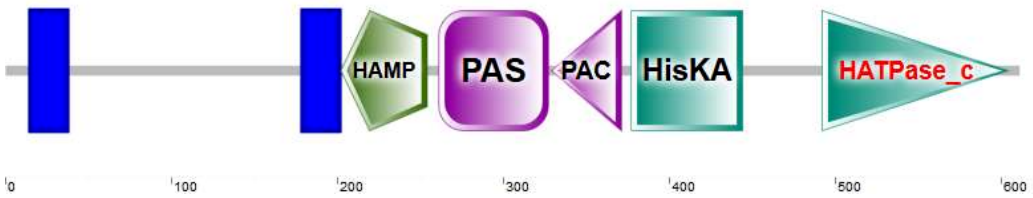


Figure 53. Représentation de l'organisation des domaines protéiques de VicK chez *E. faecalis* (SMART database)

Les résultats de cette analyse montrent que VicK présente les mêmes domaines que le senseur QseC et possède en plus un domaine PAS (nommé comme ceci d'après les trois premières protéines dans lesquelles il a été identifié) et PAC. Ces deux domaines structurels sont très souvent présents chez les protéines de signalisation.

D'après les résultats de notre analyse *in silico*, la région comprise entre les deux domaines transmembranaires est située entre les acides aminés 38 et 180. Cette séquence a été alignée avec le domaine périplasmique de QseC, et la recherche du motif signal a été effectuée [Figure 54].

```
QseC    -----TDNVDELFDTQLMLFAKRLST----LDLNEINAADRMAQTPNKLKHGHVDDDALT
VicK    LEATTISDFKKNMDSQVVQLSNTLSTQMSNKDLERSDVDANLKKALSDFSNADI----SE

QseC    FAIFTHDGRMVLNDGDNGEDIPYSYQREGFADGQLVGDKDQWRFV---------------
VicK    ARIVDDKGIIR--------------ATNDLNQQNIIGKKNDYRDLNDFTSKKYQALDNDK

QseC    -------WMTSPDGKYRIVV-----GQEWEYREDM------
VicK    RVYVNVQPIQSPTGETVIGVLYVKSNLENKYQEITNTASIF
```

Figure 54. Alignement des séquences comprises entre les domaines transmembranaires de QseC (UniProtKB - Q8X524) d'*E. coli* et VicK (UniProtKB - Q836C1) d'*E. faecalis*

La séquence VicK possède trois résidus d'acides aminés sur les cinq (KY-E-) du motif signal, en tenant compte du changement d'acides aminés possibles au sein de ce motif (remplacement de E par D, K, S ou Q).

Nous avons par la suite voulu étudier les interactions possibles entre l'épinéphrine et VicK. La structure tridimensionnelle de VicK n'étant pas disponible dans les bases de données, nous avons réalisé une modélisation prédictive de ce senseur à l'aide du logiciel I-TASSER [Figure 55]. Par la suite, une analyse de docking moléculaire a été effectuée, les résultats sont présentés sur la [Figure 56].

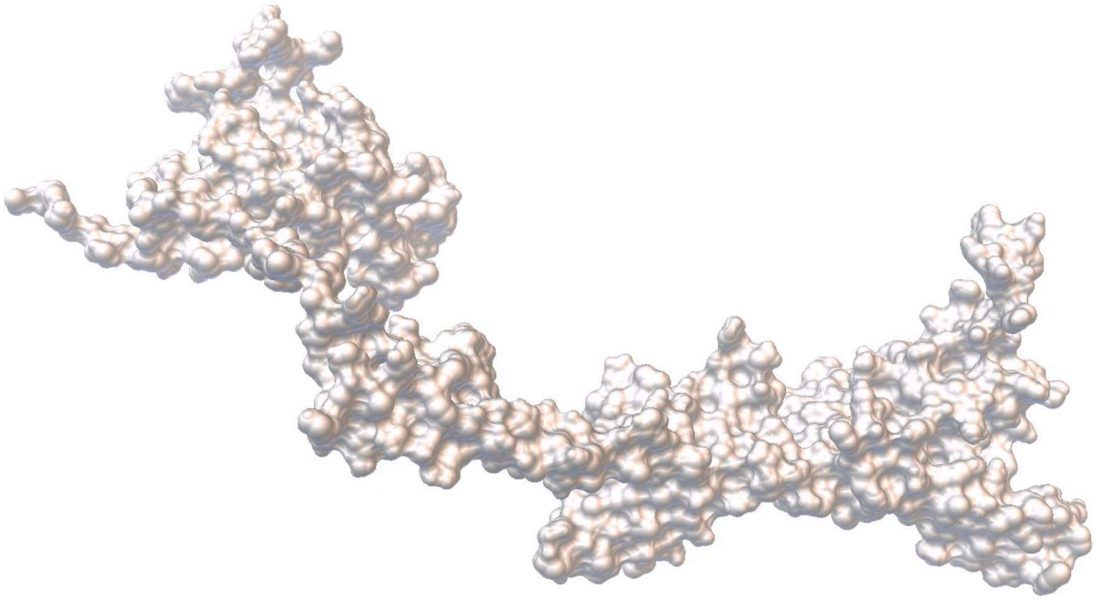


Figure 55. Structure prédictive du senseur VicK d'*E. faecalis* (réalisée par le logiciel I-TASSER)

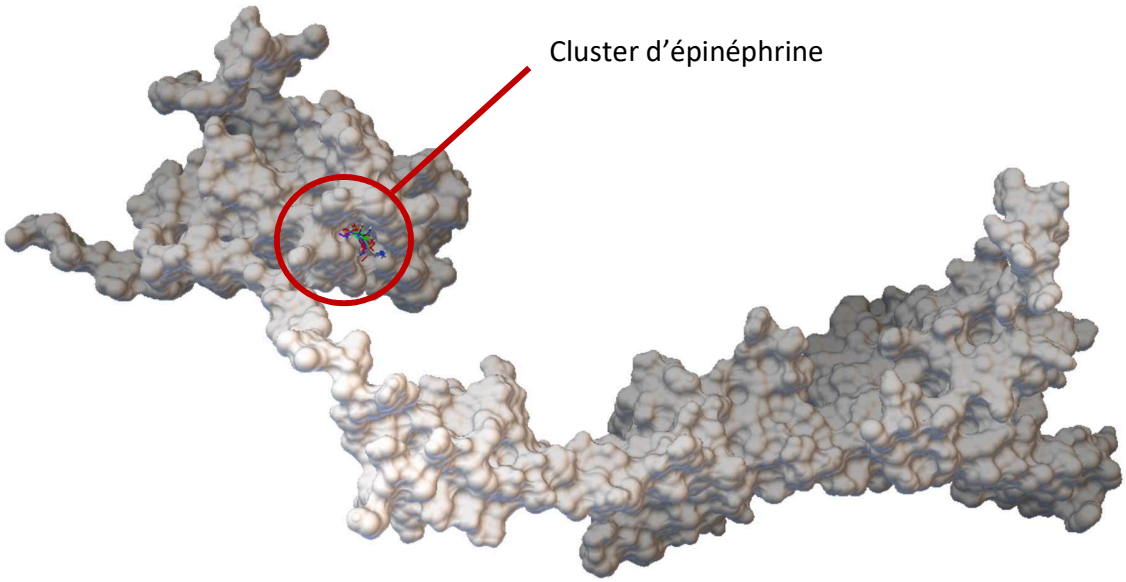


Figure 56. Modélisation des interactions entre l'épinéphrine et VicK d'*E. faecalis* (réalisée par le logiciel I-TASSER)

Les différentes prédictions constituant le cluster d'épinéphrine présentent des énergies de liaisons comprises entre -5,4 et -4,7 kcal/mol. Parmi les sites de liaison, une liaison hydrogène relie l'épinéphrine à une aspartate (Asp99) [Figure 57].

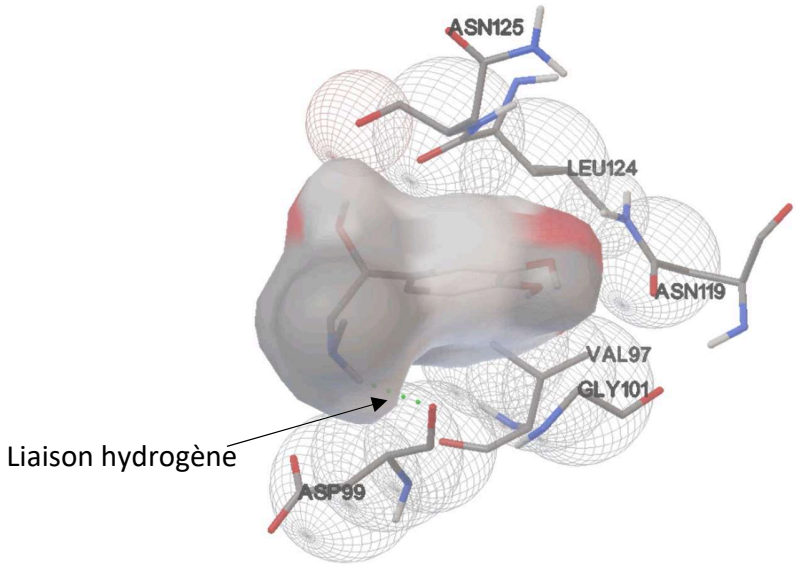


Figure 57. Interaction pour un modèle d'interaction possible entre VicK et l'épinéphrine

III. Conclusion

Chez la bactérie *E. coli*, le TCS QseBC est décrit dans la littérature comme étant impliqué dans la réponse aux catécholamines (épinéphrine et norépinéphrine). La recherche d'homologie de séquence protéique effectuée lors de ces travaux de thèse a permis de suggérer pour *P. aerugionosa*, un senseur putatif pour l'épinéphrine, PmrB possédant une identité de 31,51% avec la protéine QseC d'*E. coli* O157:H7. PmrB est le senseur du TCS PmrAB, impliqué dans la régulation de la résistance à la polymyxine B mais peut aussi être activé lorsque le taux de Mg^{2+} est faible. La cascade de régulation va permettre à la bactérie de résister à la polymyxine B par modification du LPS (**McPhee et al.**, 2003). Le senseur PmrB possède des domaines protéiques similaires à QseC, et possède également une séquence périplasmique dont une partie du motif signal d'*E. coli* est présent, les trois résidus -YRQ-. À ce jour, les informations concernant les mécanismes de perception du signal (taux de Mg^{2+}) chez le senseur PmrB ne sont pas élucidés, il n'est donc pas possible de comparer les résultats expérimentaux que nous avons obtenus pour l'épinéphrine et le docking moléculaire avec ceux de la littérature. Concernant les données sur les interactions entre le transporteur de la ferripyoverdine FpvA, situé au niveau de la membrane externe, et le complexe épinéphrine-fer, il est intéressant de noter que sept acides aminés sont en commun avec ceux impliqués dans la liaison avec le ligand naturel du récepteur FpvA, qui forme un complexe plus grand que le complexe épinéphrine-fer et que quatre sont impliqués dans des liaisons hydrogènes.

Chez *E. faecalis*, le senseur VicK, du système VicKR semblerait être l'homologue le plus proche du senseur QseC d'*E. coli*, même si le pourcentage d'identité ne dépasse pas les 30%. Pour le moment, nous n'avons pas de données disponibles dans la littérature pour comparer nos résultats avec des senseurs à l'épinéphrine déjà décrits chez des bactéries à Gram positif, donc nous avons été obligés d'utiliser un senseur d'une bactérie à Gram négatif. Nous avons trouvé que la séquence protéique de VicK est très conservée pour les quatre souches d'*E. faecalis* utilisées lors de la thèse, les deux souches pathogènes *E. faecalis* MMH594 et *E. faecalis* V583, ainsi que les deux souches probiotiques *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431 et *E. faecalis* OB15.

La présence de ce senseur putatif chez les quatre souches étudiées pourrait permettre d'expliquer en partie, qu'elles aient toutes été capables de répondre plus ou moins à la présence d'épinéphrine lors des études physiologiques de formation de biofilm et adhésion sur cellules eucaryotes.

Ce senseur VicK serait aussi hautement conservé chez les bactéries à Gram positif dont le génome comporterait un faible % GC (**Dubrac & Msadek**, 2004). Il est impliqué notamment dans le métabolisme de la paroi cellulaire et serait important pour la croissance bactérienne chez deux autres bactéries à Gram positif, *B. subtilis* et *S. aureus*. En effet, chez *B. subtilis*, le système WalKR (VicKR) régule des gènes codant des autolysines et un gène prédit pour être une protéine associée à la paroi cellulaire (**Bisicchia et al.**, 2007). Chez *E. faecalis* V583, des travaux ont montré qu'il n'était pas possible d'obtenir un mutant VicK, car celui-ci n'était pas viable (**Hancock & Perego**, 2004). Des travaux récents ont enfin mis en évidence que la production de la protéine Vick est augmentée lorsque la bactérie *E. faecium* est exposée à la sérotonine, ceci pourrait donc suggérer aussi une éventuelle implication du senseur Vick dans la reconnaissance de cette autre molécule eucaryote (communication personnelle, résultats non publiés).

Des travaux supplémentaires seront à développer afin d'approfondir le rôle de PmrB et VicK, les senseurs putatifs à l'épinéphrine, respectivement identifiés chez *P. aeruginosa* et *E. faecalis* lors de cette analyse *in silico*.

Les analyses *in silico* présentées dans ce chapitre seront intégrées dans une publication scientifique de type « review » actuellement en cours de rédaction et intitulée « Inter-kingdom signalling of stress hormones : sensing, transport and modulation of bacterial physiology ». Celle-ci sera soumise prochainement dans un research topic de *Frontiers in microbiology* (voir annexe).

Conclusion

L'épinéphrine fait partie des catécholamines, qui peuvent être sécrétées lors d'un trauma, d'un stress ou à la suite d'un acte chirurgical. Ces hormones peuvent moduler le rythme cardiaque, le besoin en énergie, la capacité respiratoire ou encore la contraction des muscles au niveau intestinal (**Andreis & Singer**, 2016). Dans la littérature scientifique, les études réalisées avec des catécholamines se sont essentiellement concentrées sur l'effet de la norépinéphrine sur des bactéries à Gram négatif. Les auteurs ont ainsi montré que cette molécule était capable de stimuler la croissance de bactéries telles qu'*E. coli* (**Freestone et al.**, 1999), *S. epidermidis* (**Lyte et al.**, 2003), mais pouvait aussi, dans certains cas, stimuler la mobilité (**Yang et al.**, 2014), la capacité des bactéries à adhérer à différents types de surfaces, biotique ou abiotique, promouvoir la formation de biofilm, ou encore augmenter la virulence bactérienne.

Chez le pathogène opportuniste *P. aeruginosa* PA14, Hugde et al., ont montré que la norépinéphrine modulait la virulence et la mobilité de la bactérie, et que le système QS Las pourrait être impliqué dans la réponse à la norépinéphrine (**Hegde et al.**, 2009). D'autres travaux chez la souche *P. aeruginosa* PAO1 ont montré que cette hormone était capable d'inhiber la production de sidérophores ainsi que l'expression du gène *toxA*, codant pour un facteur de virulence important, l'exotoxine A (**Li et al.**, 2009), mais jusqu'alors très peu d'études ont utilisé l'épinéphrine. Kelly Biaggini, lors de sa thèse (Thèse 2015), avait mis en évidence que la bactérie pathogène opportuniste *P. aeruginosa* pouvait répondre à la présence d'épinéphrine. À travers mes travaux de thèse, nous avons pu approfondir les connaissances sur les réponses de ce pathogène exposé à cette hormone de stress.

Les résultats présentés dans le chapitre I, ont permis de mettre en évidence que, dans un milieu riche de type LB, l'épinéphrine pouvait stimuler la mobilité de type swarming et affecter le twitching de *P. aeruginosa* ainsi que sa sensibilité au phage PO4. Ces résultats ouvrent la voie sur une probable implication des pili de type IV dans la réponse à l'épinéphrine. L'état de glycosylation des pili serait un mécanisme de défense contre les phages chez *P. aeruginosa* (**Harvey et al.**, 2017). Des analyses supplémentaires, telle qu'une purification de la piline majoritaire, sur laquelle se fixerait les deux phages utilisés, suivi d'une analyse des glycosylations par spectrométrie de masse, pourraient nous permettre de mieux comprendre la sensibilité de cette bactérie aux phages PO4 et Pf4. Nous avons pu montrer aussi au cours de cette étude en

milieu LB, que l'épinéphrine était capable de stimuler l'adhésion et provoquer la formation d'agrégats et de biofilm de *P. aeruginosa* en conditions dynamiques. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que cette stimulation et la présence d'agrégats pouvaient être dû à une modification de la production d'EPS (**Lyte et al.**, 2003), il serait donc intéressant d'étudier la proportion des différents EPS pouvant être produits au sein des biofilms de *P. aeruginosa*.

À travers l'étude menée en milieu sérum-SAPI (chapitre II) nous avons pu montrer que, comme ce qui a été décrit précédemment pour la norépinéphrine (**Li et al.**, 2009), l'épinéphrine pouvait inhiber la production de pyoverdine, et permettait également de stimuler la croissance bactérienne dans des conditions de milieu minimum, qui sont proches de celles que l'on peut trouver *in vivo*. Même s'il est déjà admis que le noyau catéchol de l'épinéphrine est capable de former un complexe avec le fer et peut le rendre biodisponible pour la bactérie (**Sandrini et al.**, 2010), le mécanisme par lequel la bactérie va assimiler le fer reste encore flou. Dans notre étude et d'après les analyses *in silico* que nous avons réalisées (Chapitre IV), le complexe épinéphrine-fer pourrait être transporté par un transporteur de fer comme FpvA, qui permet initialement le transport de la ferripyoverdine. Cette molécule de stress présente chez l'Homme pourrait avoir un potentiel rôle de xénosidérophore et favoriser la mise en place d'une infection bactérienne chez l'hôte, en permettant aux pathogènes d'accéder au fer initialement séquestré par les transferrines. L'utilisation de la protéine FpvA purifiée pourrait nous permettre d'étudier les interactions *in vitro* entre ce transporteur et l'épinéphrine. À supposer que l'épinéphrine passe par le transporteur FpvA, il serait possible que celle-ci se retrouve au niveau périplasmique et interagisse avec le senseur d'un TCS, comme PmrB dont le rôle est à définir plus précisément, notamment par l'utilisation d'un mutant. La reconnaissance de l'épinéphrine par un senseur pourrait alors induire une cascade de régulation amenant aux phénotypes observés précédemment.

Il est difficile, à ce stade, d'établir le mécanisme moléculaire impliqué. L'analyse du protéome global en milieu LB a mis en avant la protéine HsbA, dont le rôle central dans la voie HptB permet la transcription de gènes impliqués dans la mobilité ou la formation de biofilm. Un transcriptome global réalisé dans ce même milieu est actuellement en cours et l'analyse des résultats devrait nous apporter de nouveaux éléments, nous permettant peut-être d'établir un début de schéma

de régulation. Un transcriptome en milieu SAPI, qui se rapproche des conditions *in vivo*, pourrait nous apporter des informations supplémentaires quant aux réponses de la bactérie exposée à l'épinéphrine.

Comme nous l'avons évoqué tout au long de ces travaux de thèse, l'effet des catécholamines a été très peu étudié sur les bactéries à Gram positif. Chez *S. epidermidis* et *S. pneumoniae* la norépinéphrine est capable de stimuler la croissance ainsi que la formation de biofilm (**Freestone et al.**, 1999; **Lyte et al.**, 2003; **Sandrini et al.**, 2014). Une seule étude concernant la stimulation de la croissance en présence de norépinéphrine a été réalisée chez *E. faecalis* (**Freestone et al.**, 1999). Des travaux réalisés lors de la thèse de Kelly Biaggini (Thèse 2015), avait montré que cette bactérie était également capable de ressentir l'épinéphrine.

E. faecalis est une bactérie qui peut être utilisée dans l'industrie agro-alimentaire pour ses propriétés organoleptiques ou bien en tant que probiotique. Cependant, certaines souches pathogènes opportunistes, sont responsables d'endocardites ou encore d'infections urinaires. C'est dans ce contexte que nous avons voulu travailler en parallèle (Chapitre III) sur ce modèle à Gram positif. Nous avons étudié la réponse de souches pathogènes (MMH594 et V583) et probiotiques (Symbioflor 1 DSM 16431 et OB15) d'*E. faecalis* à la présence d'épinéphrine et de norépinéphrine. Nos travaux ont pu montrer que les effets variaient en fonction des souches. L'épinéphrine est capable de stimuler la formation de biofilm ou encore l'adhésion d'*E. faecalis* MMH594 et OB15 sur les cellules Caco-2/TC7 et HaCaT. La norépinéphrine, quant à elle, stimule l'adhésion de la souche V583 sur les cellules intestinales. Les quatre souches étudiées possèdent toutes le senseur VicK (Chapitre IV), qui semble être homologue à QseC. Ces données ne sont que préliminaires et d'autres expériences seront à entreprendre pour vérifier ces hypothèses, comme cristallographier le senseur pour avoir une idée plus précise des interactions possibles. De même, puisque nous avons vu que la norépinéphrine pouvait aussi impacter la physiologie des différentes souches d'*E. faecalis*, des études de docking moléculaire avec cette molécule et le senseur Vick devront aussi être envisagées. Il serait également intéressant, pour la suite, de voir par exemple, comment sont régulés les facteurs de virulence des souches pathogènes MMH594 et V583, en présence de catécholamines. De la même façon, chez les souches probiotiques OB15 et Symbioflor 1 DSM 16431, nous pourrions étudier l'effet des catécholamines sur les caractères

spécifiques qui sont habituellement recherchés pour les probiotiques (résistance au pH acide et aux enzymes digestives, renforcement de la barrière épithéliale). Ceci pourrait nous apporter plus de précision quant à la réponse que peuvent avoir des pathogènes et des probiotiques au sein du corps humain en présence du stress de l'hôte. Par la suite, des études de biofilms mixtes (impliquant des souches pathogènes et probiotiques) seraient d'un grand intérêt puisque cela nous permettrait de voir comment réagissent deux souches bactériennes en compétition pour une niche écologique, lorsqu'elles sont en contact d'une même molécule eucaryote. Ceci pourrait peut-être nous permettre de mieux comprendre comment l'équilibre microbien (intestinal, cutané ou pulmonaire) est perturbé en cas de stress, et peut ainsi conduire à une dysbiose, comme cela est souvent le cas dans de nombreuses pathologies.

Nous avons constaté que plusieurs concentrations en épinéphrine peuvent moduler de façon différente la réponse des bactéries, que ce soit pour les souches d'*E. faecalis* ou bien de *P. aeruginosa*. Cela nous conduit à penser que ce phénomène de réponse dose-dépendante est aussi vrai au sein du corps humain. Au vu des résultats obtenus avec les différentes souches d'*E. faecalis* il est permis de penser qu'au niveau du microbiote humain, les microorganismes répondent et s'adaptent de façon différente aux molécules présentes, telles que l'épinéphrine, la norépinéphrine ou d'autres hormones et qu'il pourrait y avoir une compétition entre ses molécules. Dans le corps humain, une multitude de substances sont présentes à un même instant, il serait donc intéressant d'étudier les effets synergiques, additifs ou au contraire antagonistes, que peuvent avoir plusieurs molécules en simultané sur une bactérie. L'utilisation de souris « *germ free* » pourrait nous aider à mieux comprendre comment réagissent deux populations différentes en présence d'une ou plusieurs molécules et ainsi tenter de se rapprocher des conditions *in vivo*.

Une étude a montré que des bactéries non pathogènes telles qu'*E. coli* K12 pouvaient ressentir la présence de norépinéphrine au niveau intestinal et la dégrader par l'intermédiaire d'une tyramine oxydase nommé TynA, en un métabolite appelé l'acide 3,4-Dihydroxymandelique (DHMA) (**Sule et al.**, 2017). Ce métabolite serait alors perçu comme un signal par des bactéries pathogènes comme *E. coli* O157:H7 pour établir une infection. Certaines bactéries pourraient donc profiter des signaux émis par d'autres pour choisir avec intérêt leur site d'infection (**Sule et al.**, 2017).

Plusieurs bactéries comme par exemple *Lactobacillus paracasei* peuvent aussi produire le neurotransmetteur GABA, et agir ainsi sur le système nerveux central, les qualifiant de psychobiotiques (**Dhakal et al.**, 2012).

Cette communication bidirectionnelle entre le microbiote et l'hôte, participe à la régulation des états d'eubiose (normobiose) et dysbiose, au sein du corps humain, il sera donc nécessaire d'élargir cette étude à d'autres microorganismes présents au sein du microbiote (autres probiotiques comme par exemple les Lactobacilles ou les Bifidobactéries, mais aussi différents pathogènes issus d'isolats cliniques).

Les résultats obtenus lors de cette thèse s'inscrivent donc dans une perspective de compréhension des interactions s'opérant entre le corps humain et les cellules procaryotes qui s'y trouvent, qu'elles soient pathogènes ou non, et apportent de nouveaux éléments, quant aux capacités des bactéries à ressentir et s'adapter à l'état physiologique de l'hôte.

Conclusion

Références

Adler, C., Corbalán, N.S., Seyedsayamdost, M.R., Pomares, M.F., de Cristóbal, R.E., Clardy, J., Kolter, R., Vincent, P.A., 2012. Catecholate Siderophores Protect Bacteria from Pyochelin Toxicity. PLoS One 7, e46754.

Ali, L., Goraya, M.U., Arafat, Y., Ajmal, M., Chen, J.-L., Yu, D., 2017. Molecular Mechanism of Quorum-Sensing in *Enterococcus faecalis*: Its Role in Virulence and Therapeutic Approaches. Int. J. Mol. Sci. 18.

Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. Mol. Microbiol. 59, 1114–1128.

Andreis, D.T., Singer, M., 2016. Catecholamines for inflammatory shock: a Jekyll-and-Hyde conundrum. Intensive Care Med. 42, 1387–1397.

Andrew, S., 2010. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [WWW Document].

Aroori, S. V, Cogan, T.A., Humphrey, T.J., 2014. Effect of noradrenaline on the virulence properties of *campylobacter* species. Int. J. Microbiol. 2014, 279075.

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H.B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E.G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W.M., Brunak, S., Doré, J., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Bork, P., Blottiere, H.M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariaz, G., Dervyn, R., Foerstner, K.U., Friss, C., Guchte, M. van de, Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., Hylckama-Vlieg, J. van, Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Kristiansen, K., Lakhdari, O., Layec, S., Roux, K. Le, Maguin, E., Mérieux, A., Minardi, R.M., M'rini, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Bork, P., 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. Nature 473, 174–180.

Axelrod, J., 1962. Purification and properties of phenylethanolamine-N-methyl transferase. J. Biol. Chem. 237, 1657–60.

Babin, B.M., Bergkessel, M., Sweredoski, M.J., Moradian, A., Hess, S., Newman, D.K., Tirrell, D.A., 2016. SutA is a bacterial transcription factor expressed during slow growth in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. 113, E597–E605.

Baccouri, O., Boukerb, A.M., Farhat, L. Ben, Zébré, A., Zimmermann, K., Domann, E., Cambronel, M., Barreau, M., Maillot, O., Rincé, I., Muller, C., Marzouki, M.N., Feuilloley, M., Abidi, F., Connil, N., 2019. Probiotic Potential and Safety Evaluation of *Enterococcus faecalis* OB14 and

OB15, Isolated from Traditional Tunisian Testouri Cheese and Rigouta, Using Physiological and Genomic Analysis. Front. Microbiol.

Banerjee, D., Martin, N., Nandi, S., Shukla, S., Dominguez, A., Mukhopadhyay, G., Prasad, R., 2007. A genome-wide steroid response study of the major human fungal pathogen *Candida albicans*. Mycopathologia.

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. J. Comput. Biol. 19, 455–477.

Bansal, T., Englert, D., Lee, J., Hegde, M., Wood, T., Jayaraman, A., 2007. Differential Effects of Epinephrine, Norepinephrine, and Indole on *Escherichia coli* O157:H7 Chemotaxis, Colonization, and Gene Expression. Infect. Immun. 75, 4597–4607.

Bao, Y., Sakinc, T., Laverde, D., Wobser, D., Benachour, A., Theilacker, C., Hartke, A., Huebner, J., 2012. Role of mprF1 and mprF2 in the pathogenicity of *Enterococcus faecalis*. PLoS One 7, e38458.

Barnes, A.M.T., Ballering, K.S., Leibman, R.S., Wells, C.L., Dunny, G.M., 2012. *Enterococcus faecalis* produces abundant extracellular structures containing DNA in the absence of cell lysis during early biofilm formation. MBio 3, e00193-12.

Bearson, B.L., Bearson, S.M.D., 2007. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica serovar Typhimurium*. Microb. Pathog. 44, 271–278.

Bearson, B.L., Bearson, S.M.D., Uthe, J.J., Dowd, S.E., Houghton, J.O., Lee, I., Toscano, M.J., Lay, D.C., 2008. Iron regulated genes of *Salmonella enterica serovar Typhimurium* in response to norepinephrine and the requirement of fepDGC for norepinephrine-enhanced growth. Microbes Infect. 10, 807–816.

Beury-Cirou, A., Tannières, M., Minard, C., Soulère, L., Rasamiravaka, T., Dodd, R.H., Queneau, Y., Dessaux, Y., Guillou, C., Vandeputte, O.M., Faure, D., 2013. At a supra-physiological concentration, human sexual hormones act as quorum-sensing inhibitors. PLoS One.

Biaggini, K., Barbey, C., Borrel, V., Feuilloley, M., Déchelotte, P., Connil, N., 2015. The pathogenic potential of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 on enterocytes can be modulated by serotonin, substance P and epinephrine. Arch. Microbiol. 197, 983–990.

Biaggini, K., Borrel, V., Szunerits, S., Boukherroub, R., N'Diaye, A., Zébré, A., Bonnin-Jusserand, M., Duflos, G., Feuilloley, M., Drider, D., Déchelotte, P., Connil, N., 2017. Substance P enhances lactic acid and tyramine production in *Enterococcus faecalis* V583 and promotes its cytotoxic effect on intestinal Caco-2/TC7 cells. Gut Pathog. 9, 20.

Bisicchia, P., Noone, D., Lioliou, E., Howell, A., Quigley, S., Jensen, T., Jarmer, H., Devine, K.M., 2007. The essential YycFG two-component system controls cell wall metabolism in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 65, 180–200.

Bjarnsholt, T., 2013. The role of bacterial biofilms in chronic infections. APMIS 121, 1–58.

Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G.P.F., Filloux, A., Voulhoux, R., 2010. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. Int. J. Med. Microbiol. 300, 534–543.

Bloom, S.R., Polak, J.M., 1987. Somatostatin. Br. Med. J. (Clin. Res. Ed). 295, 288–90.

Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30, 2114–2120.

Bordi, C., Lamy, M.C., Ventre, I., Termine, E., Hachani, A., Fillet, S., Roche, B., Bleves, S., Méjean, V., Lazdunski, A., Filloux, A., 2010. Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Mol. Microbiol. 76, 1427–1443.

Borlee, B.R., Goldman, A.D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2010. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. Mol. Microbiol. 75, 827–842.

Borrel, V., Thomas, P., Catovic, C., Racine, P.-J., Konto-Ghiorghi, Y., Lefeuvre, L., Duclairoir-Poc, C., Zouboulis, C.C., Feuilloley, M.G.J., 2019. Acne and Stress: Impact of Catecholamines on *Cutibacterium acnes*. Front. Med. 6, 155.

Bouffartigues, E., Gicquel, G., Bazire, A., Bains, M., Maillot, O., Vieillard, J., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., Hancock, R.E.W., Dufour, A., Chevalier, S., 2012. Transcription of the *oprF* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent mainly on the SigX sigma factor and is sucrose induced. J. Bacteriol. 194, 4301–11.

Bouillet, S., Ba, M., Houot, L., Iobbi-Nivol, C., Bordi, C., 2019. Connected partner-switches control the life style of *Pseudomonas aeruginosa* through RpoS regulation. Sci. Rep. 9, 6496.

Bradley, D.E., 1973. Basic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* pilus-dependent bacteriophage with a long noncontractile tail. J. Virol. 12, 1139–48.

Branda, S.S., Vik, Å., Friedman, L., Kolter, R., 2005. Biofilms: the matrix revisited. Trends Microbiol. 13, 20–26.

Brencic, A., Mcfarland, K.A., Mcmanus, H.R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S.L., Lory, S., 2009. The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. Mol. Microbiol. 73, 434–445.

Brunskill, E.W., Bayles, K.W., 1996. Identification and molecular characterization of a putative regulatory locus that affects autolysis in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 178, 611–8.

Burton, C.L., Chhabra, S.R., Swift, S., Baldwin, T.J., Withers, H., Hill, S.J., Williams, P., 2002. The growth response of *Escherichia coli* to neurotransmitters and related catecholamine drugs requires a functional enterobactin biosynthesis and uptake system. Infect. Immun. 70, 5913–5923.

Byrd, M.S., Pang, B., Mishra, M., Swords, W.E., Wozniak, D.J., 2010. The P*seudomonas aeruginosa* exopolysaccharide Psl facilitates surface adherence and NF-kappaB activation in A549 cells. MBio 1, e00140-10.

Caiazza, N.C., O'Toole, G.A., 2004. SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. J. Bacteriol. 186, 4476–85.

Caiazza, N.C., Shanks, R.M.Q., O'Toole, G.A., 2005. Rhamnolipids Modulate Swarming Motility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 187, 7351.

Calam, J., Dockray, G.J., Walker, R., Tracy, H.J., Owens, D., 1980. Molecular forms of gastrin in peptic ulcer: comparison of serum and tissue concentrations of G17 and G34 in gastric and duodenal ulcer subjects. Eur. J. Clin. Invest. 10, 241–247.

Cannon, W.B., 1915. Bodily Changes in Pain. Read Books Ltd.

Carle Gessard, 1882. Sur la coloration bleue et verte des linges à pansements. Comptes-rendus Hebd. des séances l'Académie des Sci. 94, 536–538.

Castang, S., Dove, S.L., 2012. Basis for the Essentiality of H-NS Family Members in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 194, 5101–5109.

Cezairliyan, B., Vinayavekhin, N., Grenfell-Lee, D., Yuen, G.J., Saghatelian, A., Ausubel, F.M., 2013. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* phenazines that kill *Caenorhabditis elegans*. PLoS Pathog. 9, e1003101.

Ch'ng, J.-H., Chong, K.K.L., Lam, L.N., Wong, J.J., Kline, K.A., 2019. Biofilm-associated infection by enterococci. Nat. Rev. Microbiol. 17, 82–94.

Chan, R., Acres, S.D., Costerton, J.W., 1982. Use of specific antibody to demonstrate glycocalyx, K99 pili, and the spatial relationships of K99+ enterotoxigenic *Escherichia coli* in the ileum of colostrum-fed calves. Infect. Immun. 37, 1170–80.

Cheng, H.P., Walker, G.C., 1998. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 180, 5183–91.

Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bazire, A., Tahrioui, A., Duchesne, R., Tortuel, D., Maillot, O., Clamens, T., Orange, N., Feuilloley, M.G.J., Lesouhaitier, O., Dufour, A., Cornelis, P., 2019. Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech. 1862, 706–721.

Chevrot, R., Rosen, R., Haudecoeur, E., Cirou, A., Shelp, B.J., Ron, E., Faure, D., 2006. GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. 103, 7460–7464.

Chotirmall, S.H., Smith, S.G., Gunaratnam, C., Cosgrove, S., Dimitrov, B.D., O'Neill, S.J., Harvey, B.J., Greene, C.M., McElvaney, N.G., 2012. Effect of Estrogen on *Pseudomonas* Mucoidy and

Exacerbations in Cystic Fibrosis. N. Engl. J. Med. 366, 1978–1986.

Chowers, M.Y., Keller, N., Tal, R., Barshack, I., Lang, R., Bar-Meir, S., Chowers, Y., 1999. Human gastrin: A Helicobacter pylori-specific growth factor. Gastroenterology 117, 1113–1118.

Churchill, M.E.A., Chen, L., 2011. Structural basis of acyl-homoserine lactone-dependent signaling. Chem. Rev. 111, 68–85.

Clarke, M.B., Sperandio, V., 2005. Transcriptional autoregulation by quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC) in enterohaemorrhagic E. coli (EHEC). Mol. Microbiol. 58, 441–455.

Clewell, D.B., Dunny, G.M., 2002. Conjugation and Genetic Exchange in *Enterococci*. The Enterococci 265–300.

Cogan, T.A., Thomas, A.O., Rees, L.E.N., Taylor, A.H., Jepson, M.A., Williams, P.H., Ketley, J., Humphrey, T.J., 2007. Norepinephrine increases the pathogenic potential of *Campylobacter jejuni.* Gut 56, 1060–5.

Colvin, K.M., Gordon, V.D., Murakami, K., Borlee, B.R., Wozniak, D.J., Wong, G.C.L., Parsek, M.R., 2011. The Pel Polysaccharide Can Serve a Structural and Protective Role in the Biofilm Matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Pathog. 7, e1001264.

Cooper, E., 1946. Gas-gangren following injection of adrenaline. Lancet 247, 459–461.

Cornelis, P., Bodilis, J., 2009. A survey of TonB-dependent receptors in fluorescent *pseudomonas*. Environ. Microbiol. Rep. 1, 256–262.

Cornelis, P., Dingemans, J., 2013. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. Front. Cell. Infect. Microbiol. 3, 75.

Cornelis, P., Matthijs, S., Van Oeffelen, L., 2009. Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. BioMetals 22, 15–22.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., James, G., 1994. Biofilms, the customized microniche. J. Bacteriol. 176, 2137.

Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. Science (80-.). 284, 1318–1322.

Craig, L., Pique, M.E., Tainer, J.A., 2004. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. Nat. Rev. Microbiol. 2, 363–378.

Crum, R., Borrow, B., Shackford, S., Hansbrough, J., Brown, M.R., 1988. The neurohumoral response to burn injury in patient resuscitated with hypertonic saline. J. Trauma.

Dagorn, A., Chapalain, A., Mijouin, L., Hillion, M., Duclairoir-Poc, C., Chevalier, S., Taupin, L., Orange, N., Feuilloley, M.G.J., 2013. Effect of GABA, a bacterial metabolite, on *Pseudomonas fluorescens* surface properties and cytotoxicity. Int. J. Mol. Sci. 14, 12186–204.

Davey, M.E., Caiazza, N.C., O'Toole, G.A., 2003. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J. Bacteriol. 185, 1027–36.

Denis, M., Campbell, D., Gregg, E.O., 1991. Interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulate growth of a virulent strain of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 59, 1853–6.

Denis, M., Gregg, E.O., 1991. Recombinant interleukin-6 increases the intracellular and extracellular growth of *Mycobacterium avium.* Can. J. Microbiol. 37, 479–83.

Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M.N., Tompkins, R.G., Rahme, L.G., 2004. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 1339–44.

Deziel, E., Lépine, F., Milot, S., Villemur, R., 2003. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. Microbiology 149, 2005–2013.

Dhakal, R., Bajpai, V.K., Baek, K.-H., 2012. Production of gaba (γ - Aminobutyric acid) by microorganisms: a review. Braz. J. Microbiol. 43, 1230–41.

Diaz, T.L., Santos, J., Gonzalez, C., Moreno, B., 1995. Bacteriological quality of a traditional Spanish blue cheese.

Diggle, S.P., Stacey, R.E., Dodd, C., Camara, M., Williams, P., Winzer, K., 2006. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. Environ. Microbiol. 8, 290.

Djorić, D., Kristich, C.J., 2017. Extracellular SalB Contributes to Intrinsic Cephalosporin Resistance and Cell Envelope Integrity in *Enterococcus faecalis*. J. Bacteriol. 199, e00392-17.

Dong, Y., Liu, J., Pang, M., Du, H., Wang, N., Awan, F., Lu, C., Liu, Y., 2016. Catecholamine-Stimulated Growth of *Aeromonas hydrophila* Requires the TonB2 Energy Transduction System but Is Independent of the Amonabactin Siderophore. Front. Cell. Infect. Microbiol. 6, 1–12.

Donlan, R.M., 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerg. Infect. Dis. 8, 881–890.

Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 15, 167–93.

Duan, H., Wang, J., 2010. Selective transport of monoamine neurotransmitters by human plasma membrane monoamine transporter and organic cation transporter 3. J. Pharmacol. Exp. Ther. 335, 743–53.

Dubin, K., Pamer, E.G., 2018. Enterococci and Their Interactions with the Intestinal Microbiome, in: Bugs as Drugs. American Society of Microbiology, pp. 309–330.

Dubrac, S., Msadek, T., 2004. Identification of genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 186, 1175–81.

Dunny, G.M., Brown, B.L., Clewell, D.B., 1978. Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 3479–83.

Evans, D.G., Miles, A.A., Niven, J.S.F., 1948. The enhancement of bacterial infections by adrenaline. Br. J. Exp. Pathol. 29, 20–39.

Evers, S., Courvalin, P., 1996. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS(B)-VanR (B) two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. J. Bacteriol. 178, 1302–9.

Fabret, C., Hoch, J.A., 1998. A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy. J. Bacteriol. 180, 6375–83.

Fabretti, F., Theilacker, C., Baldassarri, L., Kaczynski, Z., Kropec, A., Holst, O., Huebner, J., 2006. Alanine Esters of Enterococcal Lipoteichoic Acid Play a Role in Biofilm Formation and Resistance to Antimicrobial Peptides. Infect. Immun. 74, 4164–4171.

Finch, A.M., Sarramegna, V., Graham, R.M., 2006. Ligand Binding, Activation and Agonist Trafficking. Sites J. 20Th Century Contemp. French Stud.

Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2006. The role and application of *enterococci* in food and health. Int. J. Food Microbiol. 106, 1–24.

Francis, V.I., Stevenson, E.C., Porter, S.L., 2017. Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. 364, 1–22.

Frank, K.L., Patel, R., 2008. Intravenously administered pharmaceuticals impact biofilm formation and detachment of *Staphylococcus lugdunensis* and other staphylococci. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 60, 9–16.

Franz, C.M., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E., 1999. *Enterococci* at the crossroads of food safety? Int. J. Food Microbiol. 47, 1–24.

Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H., 2003. *Enterococci* in foods—a conundrum for food safety. Int. J. Food Microbiol. 88, 105–122.

Freestone, P.P.E., Haigh, R.D., Lyte, M., 2008. Catecholamine Inotrope Resuscitation of Antibiotic-Damaged Staphylococci and Its Blockade by Specific Receptor Antagonists. J. Infect. Dis. 197, 1044–1052.

Freestone, P.P.E., Lyte, M., Neal, C.P., Maggs, A.F., Haigh, R.D., Williams, P.H., 2000. The mammalian neuroendocrine hormone norepinephrine supplies iron for bacterial growth in the presence of transferrin or lactoferrin. J. Bacteriol. 182, 6091–8.

Freestone, P.P.E., Sharaff, F., O'Callaghan, C., Fry, H., Hirst, R.A., Sandrini, S.M., Hyman, S., 2012. *Pseudomonas aeruginosa* -Catecholamine Inotrope Interactions. Chest 142, 1200–1210.

Freestone, P.P.E., Haigh, R.D., Lyte, M., 2007. Blockade of catecholamine-induced growth by adrenergic and dopaminergic receptor antagonists in *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica*. BMC Microbiol. 7, 1–13.

Freestone, P.P.E., Haigh, R.D., Williams, P.H., Lyte, M., 2003. Involvement of enterobactin in norepinephrine-mediated iron supply from transferrin to enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 222, 39–43.

Freestone, P.P.E., Haigh, R.D., Williams, P.H., Lyte, M., 1999. Stimulation of bacterial growth by heat-stable, norepinephrine-induced autoinducers. FEMS Microbiol. Lett. 172, 53–60.

Freestone, P.P.E., Sandrini, S.M., Haigh, R.D., Lyte, M., 2008. Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection. Trends Microbiol. 16, 55–64.

Fritzenwanker, M., Kuenne, C., Billion, A., Hain, T., Zimmermann, K., Goesmann, A., Chakraborty, T., Domann, E., 2013. Complete Genome Sequence of the Probiotic *Enterococcus faecalis* Symbioflor 1 Clone DSM 16431. Genome Announc. 1.

Gallagher, L.A., McKnight, S.L., Kuznetsova, M.S., Pesci, E.C., Manoil, C., 2002. Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 184, 6472–80.

Galle, M., Carpentier, I., Beyaert, R., 2012. Structure and function of the Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. Curr. Protein Pept. Sci. 13, 831–42.

Gasser, V., Guillon, L., Cunrath, O., Schalk, I.J., 2015. Cellular organization of siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for siderosomes. J. Inorg. Biochem. 148, 27–34.

Ghysels, B., Dieu, B.T.M., Beatson, S.A., Pirnay, J.-P., Ochsner, U.A., Vasil, M.L., Cornelis, P., 2004. FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 150, 1671–1680.

Ghysels, B., Ochsner, U., Möllman, U., Heinisch, L., Vasil, M., Cornelis, P., Matthijs, S., 2005. The *Pseudomonas aeruginosa* pir A gene encodes a second receptor for ferrienterobactin and synthetic catecholate analogues. FEMS Microbiol. Lett. 246, 167–174.

Giraffa, G., 2002. *Enterococci* from foods. FEMS Microbiol. Rev. 26, 163–171.

Giraffa, G., Neviani, E., Tarelli, G.T., 1994. Antilisterial Activity by *Enterococci* in a Model Predicting the Temperature Evolution of Taleggio, an Italian Soft Cheese. J. Dairy Sci. 77, 1176–1182.

Gonzales, X.F., Castillo-Rojas, G., Castillo-Rodal, A.I., Tuomanen, E., López-Vidal, Y., 2013. Catecholamine norepinephrine diminishes lung epithelial cell adhesion of *Streptococcus pneumoniae* by binding iron. Microbiol. (United Kingdom) 159, 2333–2341.

Gross, W.B., Colmano, G., 1970. Corticosterone and ACTH as Treatments for *Escherichia Coli* Infection in Chickens. Poult. Sci. 49, 1256–1258.

Guiton, P.S., Hung, C.S., Kline, K.A., Roth, R., Kau, A.L., Hayes, E., Heuser, J., Dodson, K.W., Caparon, M.G., Hultgren, S.J., 2009. Contribution of autolysin and Sortase a during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biofilm development. Infect. Immun. 77, 3626–38.

Guragain, M., King, M.M., Williamson, K.S., Pérez-Osorio, A.C., Akiyama, T., Khanam, S., Patrauchan, M.A., Franklin, M.J., 2016. The *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Two-Component Regulator CarSR Regulates Calcium Homeostasis and Calcium-Induced Virulence Factor Production through Its Regulatory Targets CarO and CarP. J. Bacteriol. 198, 951–63.

Haas, W., Shepard, B.D., Gilmore, M.S., 2002. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. Nature 415, 84–87.

Halang, P., Toulouse, C., Geißel, B., Michel, B., Flauger, B., Müller, M., Voegele, R.T., Stefanski, V., Steuber, J., 2015. Response of *Vibrio cholerae* to the Catecholamine Hormones. J. Bacteriol. 197, 3769–3778.

Hancock, L.E., Perego, M., 2002. Two-component signal transduction in *Enterococcus faecalis*. J. Bacteriol. 184, 5819–25.

Hancock, L.E., Perego, M., 2004. Systematic Inactivation and Phenotypic Characterization of Two-Component Signal Transduction Systems of *Enterococcus faecalis* V583. J. Bacteriol. 186, 7951–7958.

Hancock, R.E., Carey, A.M., 1979. Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat- 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. J. Bacteriol. 140, 902–10.

Harvey, H., Bondy-Denomy, J., Marquis, H., Sztanko, K.M., Davidson, A.R., Burrows, L.L., 2017. *Pseudomonas aeruginosa* defends against phages through type IV pilus glycosylation. Nat. Microbiol. 3, 47–52.

Hassett, D.J., Korfhagen, T.R., Irvin, R.T., Schurr, M.J., Sauer, K., Lau, G.W., Sutton, M.D., Yu, H., Hoiby, N., 2010. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections in cystic fibrosis: insights into pathogenic processes and treatment strategies. Expert Opin. Ther. Targets 14, 117–130.

Hastie, A.T., Hingley, S.T., Higgins, M.L., Kueppers, F., Shryock, T., 1986. Rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* inactivates mammalian tracheal ciliary axonemes. Cell Motil. Cytoskeleton 6, 502–509.

Hauser, A.R., 2009. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by injection. Nat. Rev. Microbiol. 7, 654–665.

Hegde, M., Wood, T.K., Jayaraman, A., 2009. The neuroendocrine hormone norepinephrine increases *Pseudomonas aeruginosa* PA14 virulence through the las *quorum-sensing* pathway. Appl. Microbiol. Biotechnol. 84, 763–776.

Henderson, B., Wilson, M., 1996. Homo bacteriens and a network of surprises. J. Med. Microbiol.

45, 393–394.

Hendrickx, A.P.A., Willems, R.J.L., Bonten, M.J.M., Van Schaik, W., 2009. LPxTG surface proteins of *enterococci*. Trends Microbiol. 17, 423–30.

Henrichsen, J., 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. Bacteriol. Rev. 36, 478–503.

Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B.K., Molin, S., 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. Microbiology 146, 2395–2407.

Hieble, J.P., 2009. Adrenergic Receptors. Encycl. Neurosci. 135–139.

Hirt, H., Erlandsen, S.L., Dunny, G.M., 2000. Heterologous inducible expression of *Enterococcus faecalis* pCF10 aggregation substance asc10 in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus gordonii* contributes to cell hydrophobicity and adhesion to fibrin. J. Bacteriol. 182, 2299–306.

Hoang, K. Van, Wang, Y., Lin, J., 2012. Identification of genetic loci that contribute to *Campylobacter* resistance to fowlicidin-1, a chicken host defense peptide. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2, 32.

Hufnagel, M., Koch, S., Creti, R., Baldassarri, L., Huebner, J., 2004. A Putative Sugar-Binding Transcriptional Regulator in a Novel Gene Locus in *Enterococcus faecalis* Contributes to Production of Biofilm and Prolonged Bacteremia in Mice. J. Infect. Dis. 189, 420–430.

Huycke, M.M., Spiegel, C.A., Gilmore, M.S., 1991. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. 35, 1626–1634.

Inaba, M., Matsuda, N., Banno, H., Jin, W., Wachino, J. ichi, Yamada, K., Kimura, K., Arakawa, Y., 2016. In vitro reduction of antibacterial activity of tigecycline against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with host stress hormone norepinephrine. Int. J. Antimicrob. Agents 48, 680–689.

Intarak, N., Muangsombut, V., Vattanaviboon, P., Stevens, M.P., Korbsrisate, S., 2014. Growth, motility and resistance to oxidative stress of the melioidosis pathogen *Burkholderia pseudomallei* are enhanced by epinephrine. Pathog. Dis. 72, 24–31.

Jenkins, A.T.A., Buckling, A., McGhee, M., ffrench-Constant, R.H., 2005. Surface plasmon resonance shows that type IV pili are important in surface attachment by *Pseudomonas aeruginosa*. J. R. Soc. Interface 2, 255–259.

Jennings, L.K., Storek, K.M., Ledvina, H.E., Coulon, C., Marmont, L.S., Sadovskaya, I., Secor, P.R., Tseng, B.S., Scian, M., Filloux, A., Wozniak, D.J., Howell, P.L., Parsek, M.R., 2015. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 11353–8.

Johnson, E.E., Wessling-Resnick, M., 2012. Iron metabolism and the innate immune response to

infection. Microbes Infect. 14, 207–16.

Karavolos, M., Spencer, H., Bulmer, D., Thompson, A., Winzer, K., Williams, P., Hinton, J., Khan, C.A., 2008. Adrenaline modulates the global transcriptional profile of *Salmonella* revealing a role in the antimicrobial peptide and oxidative stress resistance responses. BMC Genomics 9, 458.

Karavolos, M.H., Bulmer, D.M., Spencer, H., Rampioni, G., Schmalen, I., Baker, S., Pickard, D., Gray, J., Fookes, M., Winzer, K., Ivens, A., Dougan, G., Williams, P., Khan, C.M.A., 2011. *Salmonella Typhi* sense host neuroendocrine stress hormones and release the toxin haemolysin E. EMBO Rep. 12, 252–8.

Karavolos, M.H., Winzer, K., Williams, P., Khan, C.M.A., 2013. Pathogen espionage: Multiple bacterial adrenergic sensors eavesdrop on host communication systems. Mol. Microbiol. 87, 455–465.

Karlsson, F.H., Tremaroli, V., Nookaew, I., Bergström, G., Behre, C.J., Fagerberg, B., Nielsen, J., Bäckhed, F., 2013. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. Nature 498, 99–103.

Kayaoglu, G., Ørstavik, D., 2004. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 15, 308–320.

Kellogg, S.L., Kristich, C.J., 2016. Functional Dissection of the CroRS Two-Component System Required for Resistance to Cell Wall Stressors in *Enterococcus faecalis*. J. Bacteriol. 198, 1326–36.

Kinney, K.S., Austin, C.E., Morton, D.S., Sonnenfeld, G., 2000. Norepinephrine as a growth stimulating factor in bacteria - Mechanistic studies. Life Sci. 67, 3075–3085.

Kinney, K.S., Austin, C.E., Morton, D.S., Sonnenfeld, G., 1999. Catecholamine enhancement of *Aeromonas hydrophila* growth. Microb. Pathog. 26, 85–91.

Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. Mol. Microbiol. 48, 1511–1524.

Knecht, L.D., O'Connor, G., Mittal, R., Liu, X.Z., Daftarian, P., Deo, S.K., Daunert, S., 2016. Serotonin Activates Bacterial Quorum Sensing and Enhances the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in the Host. EBioMedicine 9, 161–169.

Kong, H.H., 2011. Skin microbiome: genomics-based insights into the diversity and role of skin microbes. Trends Mol. Med. 17, 320–8.

Korir, M.L., Dale, J.L., Dunny, G.M., 2019. Role of epaQ, a previously uncharacterized *Enterococcus faecalis* gene, in biofilm development and antimicrobial resistance. J. Bacteriol. JB.00078-19.

Krause, A., Liepke, C., Meyer, M., Adermann, K., Forssmann, W.G., Maronde, E., 2001. Human

natriuretic peptides exhibit antimicrobial activity. Eur. J. Med. Res. 6, 215–8.

Kristich, C.J., Li, Y.-H., Cvitkovitch, D.G., Dunny, G.M., 2004. Esp-Independent Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis*. J. Bacteriol. 186, 154–163.

Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S.K., Cueff, A., Poulet, S.A., 2001. Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. Appl. Environ. Microbiol. 67, 2304–9.

Lanter, B.B., Davies, D.G., 2015. *Propionibacterium acnes* Recovered from Atherosclerotic Human Carotid Arteries Undergoes Biofilm Dispersion and Releases Lipolytic and Proteolytic Enzymes in Response to Norepinephrine Challenge In Vitro. Infect. Immun. 83, 3960–71.

Lanter, B.B., Sauer, K., Davies, D.G., 2014. Bacteria Present in Carotid Arterial Plaques Are Found as Biofilm Deposits Which May Contribute to Enhanced Risk of Plaque Rupture. MBio 5, 1–8.

LaSarre, B., Federle, M.J., 2013. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 77, 73–111.

Leclercq, R., 1997. *Enterococci* Acquire New Kinds of Resistance. Clin. Infect. Dis. 24, S80–S84.

Lee, J., Zhang, L., 2015. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. Protein Cell 6, 26–41.

Lee, V.T., Matewish, J.M., Kessler, J.L., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Lory, S., 2007. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. Mol. Microbiol. 65, 1474–1484.

Lesouhaitier, O., Veron, W., Chapalain, A., Madi, A., Blier, A.-S., Dagorn, A., Connil, N., Chevalier, S., Orange, N., Feuilloley, M., 2009. Gram-Negative Bacterial Sensors for Eukaryotic Signal Molecules. Sensors 9, 6967–6990.

Lewis, P., 1976. The essential action of propranolol in hypertension. Am. J. Med. 60, 837–852.

Li, L., Chen, Z., Bei, W., Su, Z., Huang, Q., Zhang, L., Chen, H., Zhou, R., 2015. Catecholamines promote *Actinobacillus pleuropneumoniae* growth by regulating iron metabolism. PLoS One 10, 1–13.

Li, L., Xu, Z., Zhou, Y., Sun, L., Liu, Z., Chen, H., Zhou, R., 2012. Global Effects of Catecholamines on *Actinobacillus pleuropneumoniae* Gene Expression. PLoS One 7, e31121.

Li, W., Lyte, M., Freestone, P.P.E., Ajmal, A., Colmer-Hamood, J.A., Hamood, A.N., 2009. Norepinephrine represses the expression of toxA and the siderophore genes in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. 71, 3831–3840.

Lindhout, T., Lau, P.C.Y., Brewer, D., Lam, J.S., 2009. Truncation in the core oligosaccharide of lipopolysaccharide affects flagella-mediated motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via modulation of cell surface attachment. Microbiology 155, 3449–3460.

Luo, G., Niesel, D.W., Shaban, R.A., Grimm, E.A., Klimpel, G.R., 1993. Tumor necrosis factor alpha binding to bacteria: evidence for a high-affinity receptor and alteration of bacterial virulence properties. Infect. Immun. 61, 830–5.

Lyte, M., 2004. Microbial endocrinology and infectious disease in the 21st century. Trends Microbiol. 12, 14–20.

Lyte, M., 1993. The role of microbial endocrinology in infectious disease. J. Endocrinol. 137, 343–345.

Lyte, M., Brown, D.R., 2018. Evidence for PMAT- and OCT-like biogenic amine transporters in a probiotic strain of *Lactobacillus*: Implications for interkingdom communication within the microbiota-gut-brain axis. PLoS One 13.

Lyte, M., Erickson, A.K., Arulanandam, B.P., Frank, C.D., Crawford, M.A., Francis, D.H., 1997. Norepinephrine-induced expression of the k99 pilus adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 232, 682–686.

Lyte, M., Ernst, S., 1991. Catecholamine induced growth of Gram negative bacteria. Pergamon Press 50, 203–212.

Lyte, M., Freestone, P.P.E., Neal, C.P., Olson, B.A., Haigh, R.D., Bayston, R., Williams, P.H., 2003. Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes. Lancet 361, 130–135.

Ma, L., Wang, J., Wang, S., Anderson, E.M., Lam, J.S., Parsek, M.R., Wozniak, D.J., 2012. Synthesis of multiple *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix exopolysaccharides is post-transcriptionally regulated. Environ. Microbiol. 14, 1995–2005.

Maccallum, W.G., Hastings, T.W., 1899. A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* (nov. spec), with a description of the microorganism. J. Exp. Med. 4, 521–34.

Madsen, K.T., Skov, M.N., Gill, S., Kemp, M., 2017. Virulence Factors Associated with Infective Endocarditis: A Mini Review. Open Microbiol. J. 11, 1–11.

Mahajan-Miklos, S., Tan, M.-W., Rahme, L.G., Ausubel, F.M., 1999. Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence Elucidated Using a *Pseudomonas aeruginosa– Caenorhabditis elegans* Pathogenesis Model. Cell 96, 47–56.

Malani, P.N., Kauffman, C.A., Zervos, M.J., 2002. Enterococcal Disease, Epidemiology, and Treatment, in: The *Enterococci*. American Society of Microbiology, pp. 385–408.

Mann, E.E., Wozniak, D.J., 2012. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. FEMS Microbiol. Rev. 36, 893–916.

Marinissen, M.J., Gutkind, J.S., 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. Trends Pharmacol. Sci. 22, 368–76.

Marisa, V., Carvalho, F., Lourdes, M., Albuquerque, R., Carvalho, M., Remio, F., 2012. Adrenaline

and Noradrenaline: Partners and Actors in the Same Play", in: Neuroscience - Dealing With Frontiers. InTech.

Mavrodi, D. V, Bonsall, R.F., Delaney, S.M., Soule, M.J., Phillips, G., Thomashow, L.S., 2001. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J. Bacteriol. 183, 6454–65.

McLaughlin, R.A., Hoogewerf, A.J., 2006. Interleukin-1β-induced growth enhancement of *Staphylococcus aureus* occurs in biofilm but not planktonic cultures. Microb. Pathog. 41, 67–79.

McPhee, J.B., Bains, M., Winsor, G., Lewenza, S., Kwasnicka, A., Brazas, M.D., Brinkman, F.S.L., Hancock, R.E.W., 2006. Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB Two-Component Regulatory Systems to Mg2+-Induced Gene Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 188, 3995.

McPhee, J.B., Lewenza, S., Hancock, R.E.W., 2003. Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 50, 205–217.

Meduri, G.U., Kanangat, S., Stefan, J., Tolley, E., Schaberg, D., 1999. Cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α Enhance In Vitro Growth of Bacteria. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 160, 961–967.

Meluleni, G.J., Grout, M., Evans, D.J., Pier, G.B., 1995. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoid exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. J. Immunol. 155, 2029–38.

Messenger, A.J., Barclay, R., 1983. Bacteria, iron and pathogenicity. Biochem. Educ. 11, 54–63.

Metz-Boutigue, M.-H., Goumon, Y., Lugardon, K., Strub, J.-M., Aunis, D., 1998. Antibacterial Peptides Are Present in Chromaffin Cell Secretory Granules. Cell. Mol. Neurobiol. 18, 249–266.

Mijouin, L., Hillion, M., Ramdani, Y., Jaouen, T., Duclairoir-Poc, C., Follet-Gueye, M.L., Lati, E., Yvergnaux, F., Driouich, A., Lefeuvre, L., Farmer, C., Misery, L., Feuilloley, M.G.J., 2013. Effects of a skin neuropeptide (substance P) on cutaneous microflora. PLoS One 8.

Mikheenko, A., Prjibelski, A., Saveliev, V., Antipov, D., Gurevich, A., 2018. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. Bioinformatics 34, i142–i150.

Min, C., Ohta, K., Kajiya, M., Zhu, T., Sharma, K., Shin, J., Mawardi, H., Howait, M., Hirschfeld, J., Bahammam, L., Ichimonji, I., Ganta, S., Amiji, M., Kawai, T., 2012. The antimicrobial activity of the appetite peptide hormone ghrelin. Peptides 36, 151–156.

Mislin, G.L.A., Schalk, I.J., 2014. Siderophore-dependent iron uptake systems as gates for antibiotic Trojan horse strategies against *Pseudomonas aeruginosa*. Metallomics 6, 408–420.

Mohamed, J.A., Teng, F., Nallapareddy, S.R., Murray, B.E., 2006. Pleiotrophic Effects of 2 *Enterococcus faecalis sagA* –Like Genes, *salA* and *salB,* Which Encode Proteins That Are

Antigenic during Human Infection, on Biofilm Formation and Binding to Collagen Type I and Fibronectin. J. Infect. Dis. 193, 231–240.

Montie, T.C., Doyle-Huntzinger, D., Craven, R.C., Holder, I.A., 1982. Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the burned-mouse model. Infect. Immun. 38, 1296–8.

Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., Olson, A.J., 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. J. Comput. Chem. 30, 2785–91.

Morse, S.A., Fitzgerald, T.J., 1974. Effect of progesterone on *Neisseria gonorrhoeae*. Infect. Immun. 10, 1370–7.

Muller, C., Sanguinetti, M., Riboulet, E., Hébert, L., Posteraro, B., Fadda, G., Auffray, Y., Rincé, A., 2007. Characterization of two signal transduction systems involved in intracellular macrophage survival and environmental stress response in *Enterococcus faecalis*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 14, 59–66.

Mundt, J.O., 1963. Occurrence of *enterococci* in animals in a wild environment. Appl. Microbiol.

N'Diaye, A., Mijouin, L., Hillion, M., Diaz, S., Konto-Ghiorghi, Y., Percoco, G., Chevalier, S., Lefeuvre, L., Harmer, N.J., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M.G.J., 2016. Effect of Substance P in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Virulence: Implication for Skin Homeostasis. Front. Microbiol. 7.

Nadal Jimenez, P., Koch, G., Thompson, J.A., Xavier, K.B., Cool, R.H., Quax, W.J., 2012. The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 76, 46–65.

Nakano, M., Takahashi, A., Sakai, Y., Kawano, M., Harada, N., Mawatari, K., Nakaya, Y., 2007. Catecholamine-induced stimulation of growth in *Vibrio* species. Lett. Appl. Microbiol. 44, 649–653.

Nallapareddy, S.R., Singh, K. V, Sillanpää, J., Garsin, D.A., Höök, M., Erlandsen, S.L., Murray, B.E., 2006. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. J. Clin. Invest. 116, 2799–807.

Neuman, H., Debelius, J.W., Knight, R., Koren, O., 2015. Microbial endocrinology: The interplay between the microbiota and the endocrine system. FEMS Microbiol. Rev. 39, 509–521.

Ng, W.-L., Winkler, M.E., 2004. Singular structures and operon organizations of essential two-component systems in species of *Streptococcus*. Microbiology 150, 3096–3098.

Nickzad, A., Déziel, E., 2014. The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development - an approach for control? Lett. Appl. Microbiol. 58, 447–453.

Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T.J., Buchanan, S.K., 2010. TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function. Annu. Rev. Microbiol.

O'Toole, G.A., Kolter, R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol. Microbiol. 30, 295–304.

Ochsner, U.A., Wilderman, P.J., Vasil, A.I., Vasil, M.L., 2002. GeneChip® expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. Mol. Microbiol. 45, 1277–1287.

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

Oglesby, A.G., Farrow, J.M., Lee, J.-H., Tomaras, A.P., Greenberg, E.P., Pesci, E.C., Vasil, M.L., 2008. The Influence of Iron on *Pseudomonas aeruginosa* Physiology. J. Biol. Chem. 283, 15558–15567.

Okshevsky, M., Meyer, R.L., 2015. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. Crit. Rev. Microbiol. 41, 341–352.

Pamp, S.J., Sternberg, C., Tolker-Nielsen, T., 2009. Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. Cytom. Part A 75A, 90–103.

Pamp, S.J., Tolker-Nielsen, T., 2007. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 189, 2531–9.

Pande, G.S.J., Suong, N.T., Bossier, P., Defoirdt, T., 2014. The catecholamine stress hormones norepinephrine and dopamine increase the virulence of pathogenic *Vibrio anguillarum* and *Vibrio campbellii.* FEMS Microbiol. Ecol. 90, 761–769.

Parsek, M.R., Greenberg, E.P., 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 8789–93.

Pesci, E.C., Milbank, J.B.J., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P., Iglewski, B.H., 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 11229–11234.

Peterson, G., Kumar, A., Gart, E., Narayanan, S., 2011. Catecholamines increase conjugative gene transfer between enteric bacteria. Microb. Pathog. 51, 1–8.

Pier, G.B., 2007. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. Int. J. Med. Microbiol. 297, 277–95.

Pier, G.B., Grout, M., Zaidi, T.S., Olsen, J.C., Johnson, L.G., Yankaskas, J.R., Goldberg, J.B., 1996. Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. Science 271, 64–7.

Pillai, D.K., Cha, E., Mosier, D., 2018. Role of the stress-associated chemicals norepinephrine, epinephrine and substance P in dispersal of *Mannheimia haemolytica* from biofilms. Vet. Microbiol. 215, 11–17.

Porat, R., Clark, B., Wolff, S., Dinarello, C., 1991. Enhancement of growth of virulent strains of *Escherichia coli* by interleukin-1. Science (80-.). 254, 430–432.

Potera, C., 1999. Microbiology:Forging a Link Between Biofilms and Disease. Science (80-.). 283, 1837–1839.

Pritchard, L., 2017. PYANI : Python module for average nucleotide identity analyses.

Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, Shenghui, Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., Peng, Y., Zhang, D., Jie, Z., Wu, W., Qin, Y., Xue, W., Li, J., Han, L., Lu, D., Wu, P., Dai, Y., Sun, X., Li, Z., Tang, A., Zhong, S., Li, X., Chen, W., Xu, R., Wang, M., Feng, Q., Gong, M., Yu, J., Zhang, Y., Zhang, M., Hansen, T., Sanchez, G., Raes, J., Falony, G., Okuda, S., Almeida, M., LeChatelier, E., Renault, P., Pons, N., Batto, J.-M., Zhang, Z., Chen, H., Yang, R., Zheng, W., Li, Songgang, Yang, H., Wang, Jian, Ehrlich, S.D., Nielsen, R., Pedersen, O., Kristiansen, K., Wang, Jun, 2012. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. Nature 490, 55–60.

Ramsey, D.M., Wozniak, D.J., 2005. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. Mol. Microbiol. 56, 309–322.

Rasko, D.A., Moreira, C.G., Li, D.R., Reading, N.C., Ritchie, J.M., Waldor, M.K., Williams, N., Taussig, R., Wei, S., Roth, M., Hughes, D.T., Huntley, J.F., Fina, M.W., Falck, J.R., Sperandio, V., 2008. Targeting QseC Signaling and Virulence for Antibiotic Development. Science (80-.). 321, 1078–1080.

Ratledge, C., Dover, L.G., 2000. Iron Metabolism in Pathogenic Bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 54, 881–941.

Reading, N.C., Torres, A.G., Kendall, M.M., Hughes, D.T., Yamamoto, K., Sperandio, V., 2007. A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin. J. Bacteriol.

Reichhardt, C., Wong, C., Silva, D.P. da, Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2018. CdrA Interactions within the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix Safeguard It from Proteolysis and Promote Cellular Packing. MBio 9, e01376-18.

Reis, R.S., Pereira, A.G., Neves, B.C., Freire, D.M.G., 2011. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* – A review. Bioresour. Technol. 102, 6377–6384.

Renaud, M., Miget, A., 1930. Role favorisant des perturbations locales causees par l'adrenaline sur le developpement des infections microbiennes. CR Seances Soc Biol Fil 103, 1052–1054.

Ringel, M.T., Brüser, T., 2018. The biosynthesis of pyoverdines. Microb. Cell 5, 424–437.

Roberts, A., Matthews, J.B., Socransky, S.S., Freestone, P.P.E., Williams, P.H., Chapple, I.L.C., 2003. Stress and the periodontal diseases: effects of catecholamines on the growth of

periodontal bacteria in vitro. Oral Microbiol. Immunol. 17, 296–303.

Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Méjean, V., Foglino, M., 2000. Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa:* why so many? Trends Microbiol. 8, 498–504.

Rossmann, F.S., Racek, T., Wobser, D., Puchalka, J., Rabener, E.M., Reiger, M., Hendrickx, A.P.A., Diederich, A.-K., Jung, K., Klein, C., Huebner, J., 2015. Phage-mediated dispersal of biofilm and distribution of bacterial virulence genes is induced by quorum sensing. PLoS Pathog. 11, e1004653.

Ruer, S., Stender, S., Filloux, A., de Bentzmann, S., 2007. Assembly of fimbrial structures in *Pseudomonas aeruginosa*: functionality and specificity of chaperone-usher machineries. J. Bacteriol. 189, 3547–55.

Sahm, D.F., Kissinger, J., Gilmore, M.S., Murray, P.R., Mulder, R., Solliday, J., Clarke, B., 1989. In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. 33, 1588–91.

Sandrini, S.M., Alghofaili, F., Freestone, P., Yesilkaya, H., 2014. Host stress hormone norepinephrine stimulates pneumococcal growth, biofilm formation and virulence gene expression. BMC Microbiol. 14, 1–12.

Sandrini, S.M., Shergill, R., Woodward, J., Muralikuttan, R., Haigh, R.D., Lyte, M., Freestone, P.P., 2010. Elucidation of the mechanism by which catecholamine stress hormones liberate iron from the innate immune defense proteins transferrin and lactoferrin. J. Bacteriol. 192, 587–594.

Sarkodie, E.K., Naveed, M., Mirjat, A.A., Saeed, M., Zhou, S., Baig, M.M.F.A., Baidoo, S.A., Ihsan, A.U., Shah, K.B., Ayuba, A., Ali, D.C., Chu, W., 2019. Influences of stress hormones on microbial infections. Microb. Pathog. 131, 270–276.

Schaible, U.E., Kaufmann, S.H.E., 2004. Iron and microbial infection. Nat. Rev. Microbiol. 2, 946–953.

Schalk, I.J., Lamont, I.L., Cobessi, D., 2009. Structure–function relationships in the bifunctional ferrisiderophore FpvA receptor from *Pseudomonas aeruginosa*. BioMetals 22, 671–678.

Schleifer, K.H., Kilpper-Balz, R., 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 31–34.

Schuster, M., Greenberg, E.P., 2007. Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. BMC Genomics 8, 287.

Schuster, M., Greenberg, P.E., 2006. A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Med. Microbiol. 296, 73–81.

Secor, P.R., Michaels, L.A., Smigiel, K.S., Rohani, M.G., Jennings, L.K., Hisert, K.B., Arrigoni, A., Braun, K.R., Birkland, T.P., Lai, Y., Hallstrand, T.S., Bollyky, P.L., Singh, P.K., Parks, W.C.,

2017. Filamentous Bacteriophage Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Alters the Inflammatory Response and Promotes Noninvasive Infection *In Vivo*. Infect. Immun. 85.

Sender, R., Fuchs, S., Milo, R., 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. PLOS Biol. 14, e1002533.

Sestok, A.E., Linkous, R.O., Smith, A.T., 2018. Toward a mechanistic understanding of Feo-mediated ferrous iron uptake. Metallomics 10, 887–898.

Shami, A., Al-Mijalli, S., Pongchaikul, P., Al-Barrag, A., AbduRahim, S., 2019. The prevalence of the culturable human skin aerobic bacteria in Riyadh, Saudi Arabia. BMC Microbiol. 19, 189.

Shankar, V., Baghdayan, A.S., Huycke, M.M., Lindahl, G., Gilmore, M.S., 1999. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. Infect. Immun. 67, 193–200.

Sifri, C.D., Mylonakis, E., Singh, K. V, Qin, X., Garsin, D.A., Murray, B.E., Ausubel, F.M., Calderwood, S.B., 2002. Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus fsr in *Caenorhabditis elegans* and mice. Infect. Immun. 70, 5647–50.

Singh, K. V., Nallapareddy, S.R., Sillanpää, J., Murray, B.E., 2010. Importance of the Collagen Adhesin Ace in Pathogenesis and Protection against *Enterococcus faecalis* Experimental Endocarditis. PLoS Pathog. 6, e1000716.

Sonnleitner, E., Schuster, M., Sorger-Domening, T., Greenberg, E.P., Bläsi, U., 2006. Hfq-dependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 147, 1105–1113.

Sperandio, V., Torres, A.G., Jarvis, B., Nataro, J.P., Kaper, J.B., 2003. Bacterial-host communication: The language of hormones. Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 8951–8956.

Steele, K.H., O'Connor, L.H., Burpo, N., Kohler, K., Johnston, J.W., 2012. Characterization of a ferrous iron-responsive two-component system in nontypeable *Haemophilus influenzae*. J. Bacteriol. 194, 6162–6173.

Stewart, P.S., Franklin, M.J., 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. Nat. Rev. Microbiol. 6, 199–210.

Stewart, P.S., William Costerton, J., 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 358, 135–138.

Stiernagle, T., 2006. Maintenance of *C. elegans*. WormBook 1–11.

Stoodle, B.J., Thom, B.T., 1970. Observations On The Intestinal Carriage Of *Pseudomonas Aeruginosa*. J. Med. Microbiol. 3, 367–375.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002. Biofilms as Complex Differentiated Communities. Annu. Rev. Microbiol. 56, 187–209.

Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E.,

Westbrock-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K.-S., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E.W., Lory, S., Olson, M. V., 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 406, 959–964.

Strosberg, A.D., 1993. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. Protein Sci. 2, 1198–209.

Sule, N., Pasupuleti, S., Kohli, N., Menon, R., Dangott, L.J., Manson, M.D., Jayaraman, A., 2017. The Norepinephrine Metabolite 3,4-Dihydroxymandelic Acid Is Produced by the Commensal Microbiota and Promotes Chemotaxis and Virulence Gene Expression in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 85.

Tendolkar, P.M., Baghdayan, A.S., Gilmore, M.S., Shankar, N., 2004. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. Infect. Immun. 72, 6032–9.

Teng, F., Wang, L., Singh, K. V, Murray, B.E., Weinstock, G.M., 2002. Involvement of PhoP-PhoS homologs in *Enterococcus faecalis* virulence. Infect. Immun. 70, 1991–6.

Theilacker, C., Sanchez-Carballo, P., Toma, I., Fabretti, F., Sava, I., Kropec, A., Holst, O., Huebner, J., 2009. Glycolipids are involved in biofilm accumulation and prolonged bacteraemia in *Enterococcus faecalis*. Mol. Microbiol. 71, 1055–1069.

Thiercelin, M.E., 1899. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene. 269–271.

Thomas, V.C., Hiromasa, Y., Harms, N., Thurlow, L., Tomich, J., Hancock, L.E., 2009. A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. Mol. Microbiol. 72, 1022–36.

Thompson, T., Marth, E., 1986. Changes in Parmesan cheese during ripening: Microflora-*coliforms, enterococci, anaerobes, propionibacteria* and *staphylococci*. Milchwissenschaft.

Torabi Delshad, S., Soltanian, S., Sharifiyazdi, H., Bossier, P., 2019. Effect of catecholamine stress hormones (dopamine and norepinephrine) on growth, swimming motility, biofilm formation and virulence factors of *Yersinia ruckeri in vitro* and an *in vivo* evaluation in rainbow trout. J. Fish Dis. 42, 477–487.

Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., Nomura, N., 2016. Environmental factors that shape biofilm formation. Biosci. Biotechnol. Biochem. 80, 7–12.

Trott, O., Olson, A.J., 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. J. Comput. Chem. 31, 455–61.

Udupa, K.N., 1978. The neurohumoral response to trauma. Am. J. Surg. 135, 403–405.

Vallet, I., Olson, J.W., Lory, S., Lazdunski, A., Filloux, A., 2001. The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 6911–6.

Van Tyne, D., Martin, M.J., Gilmore, M.S., 2013. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. Toxins (Basel). 5, 895–911.

Vasseur, P., Vallet-Gely, I., Soscia, C., Genin, S., Filloux, A., 2005. The pel genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. Microbiology 151, 985–997.

Ventre, I., Goodman, A.L., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S., Bleves, S., Lazdunski, A., Lory, S., Filloux, A., 2006. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 171–6.

Veron, W., Orange, N., Feuilloley, M.G., Lesouhaitier, O., 2008. Natriuretic peptides modify *Pseudomonas fluorescens* cytotoxicity by regulating cyclic nucleotides and modifying LPS structure. BMC Microbiol. 8, 114.

Vlisidou, I., Lyte, M., van Diemen, P.M., Hawes, P., Monaghan, P., Wallis, T.S., Stevens, M.P., 2004. The neuroendocrine stress hormone norepinephrine augments *Escherichia coli* O157:H7-induced enteritis and adherence in a bovine ligated ileal loop model of infection. Infect. Immun. 72, 5446–51.

Vorregaard, M., 2008. Comstat2 - a modern 3D imageanalysis environment for biofilms.

Wade, D.S., Calfee, M.W., Rocha, E.R., Ling, E.A., Engstrom, E., Coleman, J.P., Pesci, E.C., 2005. Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 187, 4372–80.

Wang, Y., Newman, D.K., 2008. Redox Reactions of Phenazine Antibiotics with Ferric (Hydr)oxides and Molecular Oxygen. Environ. Sci. Technol. 42, 2380–2386.

Wang, Y., Wilks, J.C., Danhorn, T., Ramos, I., Croal, L., Newman, D.K., 2011. Phenazine-1-Carboxylic Acid Promotes Bacterial Biofilm Development via Ferrous Iron Acquisition. J. Bacteriol. 193, 3606.

Waters, C.M., Antiporta, M.H., Murray, B.E., Dunny, G.M., 2003. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. J. Bacteriol. 185, 3613–23.

Weigel, W.A., Demuth, D.R., 2016. QseBC, a two-component bacterial adrenergic receptor and global regulator of virulence in *Enterobacteriaceae* and *Pasteurellaceae*. Mol. Oral Microbiol. 31, 379–397.

Weigel, W.A., Demuth, D.R., Torres-Escobar, A., Juárez-Rodríguez, M.D., 2015. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* QseBC is activated by catecholamines and iron and regulates genes

encoding proteins associated with anaerobic respiration and metabolism. Mol. Oral Microbiol. 30, 384–98.

Weiss Nielsen, M., Sternberg, C., Molin, S., Regenberg, B., 2011. *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* Biofilm in Flow Cells. J. Vis. Exp. e2383.

Wessels, D., Jooste, P.J., Mostert, J.F., 1990. Technologically important characteristics of *Enterococcus isolates* from milk and dairy products. Int. J. Food Microbiol. 10, 349–52.

West, S.E.H., 2000. *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A: Structure/Function, Production, and Intoxication of Eukaryotic Cells. Bact. Protein Toxins 67–89.

Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S., 2002. Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. Science (80-.). 295, 1487–1487.

White, S., Larsen, B., 1997. *Candida albicans* morphogenesis is influenced by estrogen. Cell. Mol. Life Sci. 53, 744–9.

Wilson, R., Sykes, D.A., Watson, D., Rutman, A., Taylor, G.W., Cole, P.J., 1988. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium. Infect. Immun. 56, 2515–7.

Woods, D.E., Jones, A.L., Hill, P.J., 1993. Interaction of insulin with *Pseudomonas pseudomallei*. Infect. Immun. 61, 4045–50.

Wretlind, B., Pavlovskis, O.R., 1983. *Pseudomonas aeruginosa* Elastase and Its Role in *Pseudomonas* Infections. Clin. Infect. Dis. 5, S998–S1004.

Wu, L., Estrada, O., Zaborina, O., Bains, M., Shen, L., Kohler, J.E., Patel, N., Musch, M.W., Chang, E.B., Fu, Y.-X., Jacobs, M.A., Nishimura, M.I., Hancock, R.E.W., Turner, J.R., Alverdy, J.C., 2005. Recognition of Host Immune Activation by *Pseudomonas aeruginosa*. Science (80-.). 309, 774–777.

Xu, F., Wu, C., Guo, F., Cui, G., Zeng, X., Yang, B., Lin, J., 2015. Transcriptomic analysis of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 in response to epinephrine and norepinephrine. Front. Microbiol. 6, 1–11.

Yamashita, K., Kaneko, H., Yamamoto, S., Konagaya, T., Kusugami, K., Mitsuma, T., 1998. Inhibitory effect of somatostatin on proliferation *in vitro*. Gastroenterology 115, 1123–1130.

Yang, Q., Anh, N.D.Q., Bossier, P., Defoirdt, T., 2014. Norepinephrine and dopamine increase motility, biofilm formation, and virulence of *Vibrio harveyi*. Front. Microbiol. 5, 1–12.

Yuen, G.J., Ausubel, F.M., 2014. *Enterococcus* infection biology: Lessons from invertebrate host models. J. Microbiol. 52, 200–210.

Zav'yalov, V.P., Chernovskaya, T. V., Navolotskaya, E. V., Karlyshev, A. V., MacIntyre, S.,

Vasiliev, A.M., Abramov, V.M., 1995. Specific high affinity binding of human interleukin 1β by Caf1A usher protein of *Yersinia pestis*. FEBS Lett. 371, 65–68.

Zulianello, L., Canard, C., Köhler, T., Caille, D., Lacroix, J.-S., Meda, P., 2006. Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 74, 3134–47.

Annexes

Abstract pour review accepté et en cours de rédaction

Research Topic

Microbial Systems as Paradigms Of Successful And Sustainable Interactions

Submitted 10/07/2019, Frontiers in Microbiology

Inter-kingdom signalling of stress hormones : sensing, transport and modulation of bacterial physiology

Sophie Rodrigues[1], **Mélyssa Cambronel**[1], Amine Mohamed Boukerb[1], Marc Feuilloley[1], Nathalie Connil[1]

[1]Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) EA 4312, Université de Rouen, Normandie Université, Évreux, France.

Prokaryotes and eukaryotes have coexisted for millions of years. The hormonal communication between microorganisms and their hosts, dubbed inter-kingdom signaling, is a recent field of research. Eukaryotic signals such as hormones, neurotransmitters or immune system molecules have been shown to modulate bacterial physiology. Among them, catecholamines hormones epinephrine/norepinephrine, released by stress, physical effort or used therapeutically as inotrope have been described to affect bacterial behaviors (motility, biofilm formation, virulence) of various Gram-negative bacteria (*Escherichia coli, Salmonella Typhimurium, Pseudomonas aeruginosa, Vibrio* sp). More recently, these molecules were also shown to influence the physiology of some Gram-positive bacteria. In *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*, the stress-associated mammalian hormones epinephrine and norepinephrine trigger a signaling cascade by interacting with the QseC sensor protein. No catecholamines sensors have been identified yet in other bacteria. This review will aim to report the state of the art of catecholamines sensors in eukaryotes and prokaryotes, their transport, known effects on bacteria, and bioinformatic analysis will help to discover new putative sensors.

Article en co-auteurs

frontiers in Microbiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 06 August 2018
doi: 10.3389/fmicb.2018.01685

Evaluation of Probiotic Properties and Safety of *Enterococcus faecium* Isolated From Artisanal Tunisian Meat "Dried Ossban"

*Mohamed Zommiti[1], Mélyssa Cambronel[2], Olivier Maillot[2], Magalie Barreau[2], Khaled Sebei[1], Marc Feuilloley[2], Mounir Ferchichi[1,3] and Nathalie Connil[2]**

[1] *Unité de Protéomique Fonctionnelle et Potentiel Nutraceutique de la Biodiversité de Tunisie, Institut Supérieur des Sciences Biologiques Appliquées de Tunis, Université de Tunis El Manar, Tunis, Tunisia,* [2] *Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement, Université de Rouen Normandie, Evreux, France,* [3] *Clinical Laboratory Department, College of Applied Medical Sciences, King Faisal University, Al-Ahsa, Saudi Arabia*

Enterococcus faecium strains were isolated from an original biotope, artisanal dried Tunisian meat "Dried Ossban," and evaluated for safety and capacity as probiotics. Gram-positive, catalase negative, and bacteriocin-producing bacteria were screened using selective microbiological media. All isolates were identified by phenotypic and molecular tools. Five *E. faecium* strains (MZF1, MZF2, MZF3, MZF4, and MZF5) were selected and further assessed for their probiotic properties. They were found to be resistant to the physiological concentrations of bile salts, and the harsh conditions of the gastrointestinal tract, and showed autoaggregation and adhesion ability. All these isolates possess at least one enterocin and could efficiently inhibit the growth of *Listeria innocua* HPB13. The analysis of their safety profile revealed for almost all the strains the absence of cytotoxicity and virulence determinants, and susceptibility to clinically important antibiotics such as vancomycin. These data suggest that these bacteria, isolated from "Dried Ossban," do not present a risk to human health, and may be considered as interesting candidates for future use as probiotics and bioprotective cultures for application in the food and/or feed industries.

Keywords: ***Enterococcus faecium*, probiotics, Dried Ossban, safety, antibiotic resistance, virulence determinants**

Ma contribution à ces travaux à consister à réaliser des analyses PCR dans le but de rechercher la présence de gènes codant des bactériocines connues dans des souches d'*E. faecium* isolées d'un produit Tunisien.

frontiers in Microbiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 06 August 2018
doi: 10.3389/fmicb.2018.01685

Evaluation of Probiotic Properties and Safety of *Enterococcus faecium* Isolated From Artisanal Tunisian Meat "Dried Ossban"

*Mohamed Zommiti[1], Mélyssa Cambronel[2], Olivier Maillot[2], Magalie Barreau[2], Khaled Sebei[1], Marc Feuilloley[2], Mounir Ferchichi[1,3] and Nathalie Connil[2]**

[1] Unité de Protéomique Fonctionnelle et Potentiel Nutraceutique de la Biodiversité de Tunisie, Institut Supérieur des Sciences Biologiques Appliquées de Tunis, Université de Tunis El Manar, Tunis, Tunisia, [2] Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement, Université de Rouen Normandie, Évreux, France, [3] Clinical Laboratory Department, College of Applied Medical Sciences, King Faisal University, Al-Ahsa, Saudi Arabia

Enterococcus faecium strains were isolated from an original biotope, artisanal dried Tunisian meat "Dried Ossban," and evaluated for safety and capacity as probiotics. Gram-positive, catalase negative, and bacteriocin-producing bacteria were screened using selective microbiological media. All isolates were identified by phenotypic and molecular tools. Five *E. faecium* strains (MZF1, MZF2, MZF3, MZF4, and MZF5) were selected and further assessed for their probiotic properties. They were found to be resistant to the physiological concentrations of bile salts, and the harsh conditions of the gastrointestinal tract, and showed autoaggregation and adhesion ability. All these isolates possess at least one enterocin and could efficiently inhibit the growth of *Listeria innocua* HPB13. The analysis of their safety profile revealed for almost all the strains the absence of cytotoxicity and virulence determinants, and susceptibility to clinically important antibiotics such as vancomycin. These data suggest that these bacteria, isolated from "Dried Ossban," do not present a risk to human health, and may be considered as interesting candidates for future use as probiotics and bioprotective cultures for application in the food and/or feed industries.

Keywords: ***Enterococcus faecium*, probiotics, Dried Ossban, safety, antibiotic resistance, virulence determinants**

OPEN ACCESS

Edited by:
Fatih Ozogul,
Çukurova University, Turkey

Reviewed by:
Giuseppe Spano,
University of Foggia, Italy
Daniela Fiocco,
University of Foggia, Italy

***Correspondence:**
Nathalie Connil
nathalie.connil@univ-rouen.fr

Specialty section:
This article was submitted to Food Microbiology, a section of the journal Frontiers in Microbiology

Received: *06 May 2018*
Accepted: *06 July 2018*
Published: *06 August 2018*

Citation:
Zommiti M, Cambronel M, Maillot O, Barreau M, Sebei K, Feuilloley M, Ferchichi M and Connil N (2018) Evaluation of Probiotic Properties and Safety of Enterococcus faecium Isolated From Artisanal Tunisian Meat "Dried Ossban". Front. Microbiol. 9:1685. doi: 10.3389/fmicb.2018.01685

INTRODUCTION

Enterococci are ubiquitous microorganisms, widespread in the environment. In fact, they represent the common members of the commensal microbiota in the intestine of humans, mammals, and other animals encompassing reptiles, birds, and insects, but they are also found in other complex ecosystems such as soil, plants, water, waste, food, and feed (Foulquié Moreno et al., 2006; Byappanahalli et al., 2012). Moreover, *Enterococcus* species are widely present in traditional fermented foods (Giraffa, 2003) due to their amazing capacity to withstand extreme temperature (Murray, 1990), high salinity, and pH levels (Franz et al., 2011). They can grow in the presence of 40% (w/v) bile salts (Fisher and Phillips, 2009). These special characteristics of adaptability to various matrices and conditions may also allow these bacteria to cause spoilage of a wide range of food products, particularly, meat and its derivatives (Björkroth et al., 2005).

Enterococci are increasingly investigated as potential probiotic candidates. Currently, two strains belonging to the genus *Enterococcus* are identified as probiotics and are available on the market, also known as *Enterococcus faecium* SF68® (NCIMB 10415, Cerbios-Pharma SA, Barbengo, Switzerland) and *Enterococcus faecalis* Symbioflor 1 (SymbioPharm, Herborn, Germany). Bybee et al. (2011) have demonstrated the probiotic potential of *E. faecium* SF68® to prevent and treat diarrhea in pets, and *E. faecalis* Symbioflor 1 has been proved efficient for patients suffering from chronic sinusitis and/or bronchitis (Franz et al., 2011). The assessment of the effectiveness of probiotic strains such as *E. faecium* SF68® (NCIMB 10415) and *E. faecalis* Symbioflor 1 in humans for the treatment of diarrhea, irritable bowel syndrome, in lowering serum cholesterol and for immune regulation has been investigated in very few studies (Franz et al., 2011; Christoffersen et al., 2012; Yamaguchi et al., 2013). As a result, there are not enough data to firmly conclude on the efficiency of enterococci as probiotics for humans and their use in foods must be based on case-by-case investigations (Ogier and Serror, 2008).

Producing antimicrobial substances preventing pathogens can be a reliable criterion when selecting probiotic strains. Among lactic acid bacteria (LAB), enterococci are known to secrete various antimicrobial compounds, so these bacteria seem potentially useful to prevent diseases of bacterial foodborne origins (Franz et al., 2011). Numerous enterococci produce at least one bacteriocin, a bioactive substance of proteinaceous nature, which is ribosomally synthesized and active against a broad collection of spoiling and foodborne microbes encompassing *Listeria* spp. (Favaro et al., 2014). In the last decade, numerous studies have been published on bacteriocin-producing enterococci in association with food ecosystems (Todorov et al., 2010; Hadji-Sfaxi et al., 2011) and their isolation from various ecological biotopes, encompassing meat (Cintas et al., 1995), vegetables (Bennik et al., 1998), soil (Yanagida et al., 2005), crops (Todorov et al., 2005), fish (Satish Kumar et al., 2011), dairy products (Chanos and Williams, 2011), and humans (Gálvez et al., 1986).

However, Enterococci have also gained notoriety and sturdiness over the past few years as the leading nosocomial pathogens (Rosenthal et al., 2008). According to Schaberg et al. (1991), enterococcal species are well recognized as the second-most common causal agent of urinary tract infections and the third-most for nosocomial bacteraemia. Clinically, vancomycin-resistant Enterococci (VRE) represent a major problem in nosocomial infections (Arias and Murray, 2012). These bacteria often possess multiple antibiotic resistances and virulence factors such as hemolysin, adhesins, and invasins (Ogier and Serror, 2008; Franz et al., 2011). For all the reasons previously mentioned, enterococci species are generally considered to have a doubtful status for food safety (Ladero et al., 2012).

In this work, we report for the first time the isolation and characterization of five enterococci from "Dried Ossban," a traditional Tunisian fermented meat product. Their safety, probiotic potential, and antimicrobial properties have been investigated.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and Isolation of Lactic Acid Bacteria (LAB)

Lactic acid bacteria strains were isolated from "Dried Ossban," a Tunisian traditional dry fermented meat typically prepared from sheep intestine and meat mixed with salt and spices and dried through exposure for several days to sunlight. The samples were obtained from homemade production of fermented meat, from various governorates covering almost all the Tunisian territory. Samples were collected into sterile bottles and then transported on ice to the laboratory for analyses. For all samples, 10 g was added to 90 ml of sterile peptone saline water and homogenized for 10 min through vortexing at maximum speed. Appropriate decimal dilutions were plated onto de Man Rogosa Sharpe (MRS) agar and incubated at 37°C for 24–48 h. Colonies were randomly selected from MRS agar, and only Gram-positive and catalase-negative isolates were retained, routinely propagated, and stored at −80°C in MRS broth containing 20% glycerol. For experimental assays, working cultures were sub-cultured (1% inoculum, 24 h, 37°C) prior to use.

Identification of the LAB Isolates by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

The Gram-positive and catalase negative LAB isolated from "Dried Ossban" were identified by analysis of the total proteome using an Autoflex III matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF MS; Bruker, Marcy-l'Etoile, France) coupled to the MALDI-Biotyper 3.1 algorithmic system for microbial identification. Briefly, each bacterium was cultured on MRS agar for 24 h and the colonies were analyzed by direct spot on the MALDI target plate or using the 70% formic acid protein extraction method, as previously described (Hillion et al., 2013).

The MALDI target plate was introduced into the MALDI-TOF MS for automated measurement and data interpretation. The instrument was calibrated using a Bruker bacterial test standard and spectra were acquired in the linear mode over a mass range from 2000 to 20,000 Da. The spectrum of each unknown bacterium was electronically transformed into the peak list and compared to the 6903 reference organisms in the database and a log(score) value between 0.00 and 3.00 was generated which represents the probability that the match is correct. A score of $\geq$1.7 indicates genus identification, and a score of $\geq$2.0 is the set threshold for determination at the species level (Sogawa et al., 2011).

Acid and Bile Salt Tolerance

For the acid tolerance assays, MRS broth was used to simulate the acidity of the gastrointestinal tract after adjusting to pH 3.0 with 1 N HCl. Fresh overnight cultures of *E. faecium* strains isolated from "Dried Ossban" and previously identified by MALDI-TOF MS were centrifuged (8000 rpm, 10 min),

washed with phosphate buffer saline (PBS), and resuspended to approximately 10^7 bacteria/ml in the MRS broth pH 3.0. Samples (0.1 ml) were taken at 0 h and after 1, 2, and 3 h incubation at 37°C, simulating the time spent in the human stomach. The number of bacterial cells was then enumerated by the pour plate method of all samples using decimal serial dilutions prepared in PBS, and after 24 h incubation at 37°C. Survival bacteria were expressed as log values of colony-forming units per ml (CFU/ml).

The bile salt tolerance was tested as previously described by Anandharaj et al. (2015) with slight modifications. Bacteria from overnight cultures were inoculated (1% v/v) into MRS broth containing 0.3% (w/v) Ox-bile (Sigma–Aldrich). Total viable counts were determined after 0, 1, 2, and 3 h of exposure to bile salts, reflecting the time that food spends in the small intestine. Aliquots were diluted, plated on MRS agar, and incubated at 37°C for 24 h. Samples without addition of bile salts served as controls. Survival bacteria were expressed as described above for acid tolerance.

Autoaggregation

Autoaggregation of the *E. faecium* strains isolated from "Dried Ossban" was assessed according to Collado et al. (2008). Overnight cultures were centrifuged (8000 rpm, 10 min), washed twice with PBS, and resuspended in the same buffer to approximately 10^8 bacteria/ml. Each suspension (4 ml) was vortexed for 20 s and incubated at room temperature. The absorbance at 600 nm (A_{600}) of the upper part of each suspension was measured at time 0 h and 24 h after incubation without vortexing. The percentage of autoaggregation of each strain was then calculated according to the following equation:

Autoaggregation (%) = $[1 - (A_{\text{Time}}/A_0) \times 100]$, where A_{Time} refers to the absorbance of the suspension at 24 h and A_0 refers to the absorbance at time 0.

Caco-2/TC7 Culture

The human colon adenocarcinoma cell line Caco-2/TC7 (passages 40–60) were routinely grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen, France), supplemented with 15% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), and 100 U/ml each of penicillin and streptomycin. The cells were cultivated at 37°C in 5% CO_2–95% air atmosphere, and the medium was regularly changed. For adhesion and cytotoxicity assays, the cells were seeded in 24-well tissue culture plates and incubated to confluence, and for transepithelial electrical resistance (TEER) measurements, they were grown on inserts (3 μm pore size) until full differentiation (21 days).

In vitro Adhesion Assays

E. faecium strains, grown overnight in MRS broth, were harvested by centrifugation (8 000 rpm, 10 min), washed twice in PBS solution, and resuspended in cell culture medium, without serum and antibiotic, at a concentration of 10^8 bacteria/ml, and then applied on confluent Caco-2/TC7 monolayers as previously described for other bacteria (Messaoudi et al., 2012). Briefly, after 3 h of incubation at 37°C, in 5% CO_2–95% air atmosphere, monolayers were gently washed three times with sterile pre-warmed PBS, to remove non-adherent bacteria, and disrupted by incubation for 15 min with 0.1% Triton X100. The lysates were then diluted and plated onto MRS agar to determine the number of adherent bacteria.

Cytotoxicity Assay

The cytotoxicity was determined using an enzymatic assay (Cytotox 96 Promega, France) which measures lactate dehydrogenase (LDH) released from the cytosol of damaged Caco-2/TC7 cells into the supernatant. LDH is a stable cytosolic enzyme present in many different cell types, particularly in eukaryotic cells, playing the role of an indicator of necrotic cell death when released. After overnight incubation with the *E. faecium* strains (10^8 bacteria/ml), the supernatants from confluent Caco-2/TC7 monolayers grown on 24-well tissue culture plates were collected and the concentration of the LDH was quantified. Two controls were included for calculation of cytotoxicity percentage. Caco-2/TC7 cells exposed to Triton X100 (0.9%) were used as a positive control of maximal LDH release (100% lysis) as specified by the manufacturer's recommendations. The background level (0% LDH release) was determined with serum-free culture medium.

Transepithelial Electrical Resistance (TEER)

The TEER of differentiated Caco-2/TC7 cells was monitored during 24 h using the Millicell Electrical Resistance System (Millipore Corp., Bedford, MA, United States). To study the potential effect of *E. faecium* strains on the epithelial barrier integrity, these bacteria were incubated at 10^8 bacteria/ml on the Caco-2/TC7 cell monolayers. Control monolayers were not exposed to the potential probiotics. TEER values were expressed as percentages of the initial level measured in the insert.

DNA Extraction

Bacterial cells from overnight cultures in MRS broth of the five *E. faecium* strains identified from "Dried Ossban" were harvested by centrifugation at 8000 rpm for 10 min. Total genomic DNA was extracted and highly purified via GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, France) according to the manufacturer's recommendations. DNA quality and concentration were determined by measuring optical density (OD) at 260 and 280 nm with a spectrophotometer.

Screening for Genes Encoding Virulence Determinants and Resistance to Vancomycin

The virulence factors of the *E. faecium* strains were investigated by PCR amplification, revealing the presence of genes encoding for aggregation substance (*agg*), gelatinase (*gelE*), enterococcal surface protein (*esp*), and collagen adhesin (*ace*), (Eaton and Gasson, 2001; Reviriego et al., 2005). Primer sequences and fragment sizes are presented in **Table 1**. PCR for virulence determinant genes was performed using PCR protocols of (Mannu et al., 2003; Reviriego et al., 2005). The amplified

TABLE 1 | PCR primers used for detection of virulence determinants, antibiotic resistance, biogenic amines, and enterocin genes.

Target genes	Oligonucleotide sequence (5′–3′)	Product size (bp)	Reference
Virulence			
agg (aggregation substance)	F: AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC	1553	Eaton and Gasson, 2001
	R: AAACGGCAAGACAAGTAAATA		
gelE (gelatinase)	F: ACCCCGTATCATTGGTTT	419	
	R: ACGCATTGCTTTTCCATC		
esp (enterococcal surface protein)	F: TTGCTAATGCTAGTCCACGACC	933	
	R: GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA		
ace (adhesion of collagen protein)	F: AAAGTAGAATTAGATCACAC	350	Duprè et al., 2003
	R: TCTATCACATTCGGTTGCG		
Antibiotic resistance			
vanA (vancomycin resistance)	F: CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA	1030	Clark et al., 1993
	R: CATGAATAGAATAAAAGTTGCAAT		
vanB (vancomycin resistance)	F: GTGACAAACCGGAGGCGAGGA	433	
	R: CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA		
Biogenic amines			
hdc1 (histidine decarboxylase)	F: AGATGGTATTGTTTCTTATG	367	Khalkhali and Mojgani, 2017
	R: AGACCATACACCATAACCTT		
hdc2 (histidine decarboxylase)	F: AAYTCNTTYGAYTTYGARAARGARG	534	
	R: ATNGGNGANCCDATCATYTTRTGNCC		
tdc (tyrosine decarboxylase)	F: ACATAGTCAACCATRTTGAA	1100	
	R: CAAATGGAAGAAGAAGTAGG		
Enterocins			
Ent A (*Enterocin* A)	F: AAATATTATGGAAATGGAGTGTAT	126	Du Toit et al., 2000
	R: GCACTTCCCTGGAATTGCTC		
Ent B (*Enterocin* B)	F: GAAAATGATCACAGAATGCCTA		
	R: GTTGCATTTAGAGTATACATTTG	162	
Ent P (*Enterocin* P)	F: TATGGTAATGGTGTTTATTGTAAT		Wieckowicz et al., 2011
	R: ATGTCCCATACCTGCCAAAC	112	

products were separated by electrophoresis on 1% (w/v) agarose gels in 1× Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer. Gels were stained with SYBR Safe DNA gel stain and visualized under UV light.

The strains were also evaluated for *vanA* and *vanB* genes (both related to vancomycin resistance) by PCR reaction according to the protocol of Clark et al. (1993). The primer sequences are described in **Table 1**.

Detection of Amino Acid Decarboxylase Genes

The potential of the *E. faecium* strains to produce histamine and tyramine was assessed via molecular tools. Genes related to the production of these biogenic amines are part of the genetic heritage of *Enterococcus* spp. (Connil et al., 2002). Analysis of the histidine and tyrosine decarboxylase encoding genes (*hdc* and *tdc*, respectively) in MZF1–MZF5 strains was carried out by PCR amplification with the primers previously used by Khalkhali and Mojgani (2017). PCR primers and sizes of the resulted amplicons are listed in **Table 1**. PCR reactions were performed using the following cycling parameters: initial denaturation for 5 min at 95°C followed by 35 cycles of 1 min at 95°C, annealing at 54°C for 30 s, and 1 min at 72°C and a final extension step of 5 min at 72°C.

Detection of Bacteriocin Structural Genes by PCR and Antibacterial Activity

The presence of the main enterocin genes was screened by PCR amplification. Total DNA from the five *E. faecium* strains was submitted to PCR reactions to detect genes responsible for codification of the following bacteriocins: enterocin A, enterocin B, and enterocin P (**Table 1**). The PCR amplification conditions were as already described (Du Toit et al., 2000; Wieckowicz et al., 2011).

For detection of antibacterial activity, a well agar diffusion test of the *E. faecium* isolates was carried out as previously (Jacobsen et al., 1999) using smooth brain heart infusion (BHI) agar, containing the indicator strains (*Listeria innocua* HPB13, *E. faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, or *Escherichia coli* DH5α).

Antibiotic Susceptibility Testing

The antibiotic susceptibility of the *E. faecium* strains was checked by the broth microdilutions method. The antibiotics tested were ampicillin, vancomycin, gentamycin, erythromycin, ofloxacin, tetracycline, and chloramphenicol (**Table 2**). In brief, 100 μl of *E. faecium* strains (1.10^5 bacteria/well final concentration) were inoculated into the wells of a 96-well plate containing 100 μl of each antibiotic in serial twofold

TABLE 2 | List of antibiotics used in the study.

Name of drug	Antibiotic group	Mode of action
Ampicillin	β-Lactams	Inhibitors of the cell wall synthesis
Vancomycin	Glycopeptides	
Ofloxacin	Quinolones	Inhibiting DNA replication and transcription
Gentamycin	Aminoglycosides	Inhibitors of protein synthesis
Erythromycin	Macrolides	
Chloramphenicol	Others	
Tetracycline	Tetracyclines	

dilutions from 512 to 0.125 μg/ml, and then were incubated for 24 h. The results were compared with growth control (enterococci alone), and the minimum inhibitory concentration (MIC) breakpoint is the concentration where no growth is observed. The level of susceptibility to antibiotics was reported as sensitive, intermediate or resistant according to the observed breaking points recommended for enterococci by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) antimicrobial susceptibility testing standards (CLSI, 2015).

Statistical Analysis

Data are expressed as a mean ± standard error (SE) calculated over three independent experiments performed in triplicate. Analysis of statistical significance was performed by ANOVA. Student's *t*-test was used, when necessary, to discriminate differences between means. Differences with P-value < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of *Enterococcus faecium* Strains

Thirty-seven samples of artisanal dried Tunisian meat "Dried Ossban" were collected from homemade production in different governorates of the Tunisian territory to isolate potential probiotics from the lactic acid flora. The strains were first presumptively identified by phenotypic analysis (Gram staining, cellular morphology, catalase, and oxidase tests). Five presumptive *Enterococcus* strains (Gram$^+$ coccus, catalase, and oxidase negative) were selected for further study and called MZF1, MZF2, MZF3, MZF4, and MZF5. Their growth in various conditions of temperature, salinity, and pH was examined. All these strains were able to grow at 45°C, in 6.5% NaCl, and at pH 9.6 but not pH 4. These characteristics are well known for *Enterococcus* as this genus has an extraordinary capacity to grow under hostile conditions. MZF1, MZF2, MZF3, MZF4, and MZF5 were then analyzed by Maldi Biotyper for confirmation of the genus *Enterococcus* and determination of the species. The five strains were identified as *E. faecium* with score > 2 and accordingly to the library of Maldi Biotyper, a dendrogram was generated from the minimal spanning tree (MSP) data set (Elbehiry et al., 2017). For this, the main spectra of the Maldi Biotyper taxonomy were compared with the spectra resulting in a matrix of cross-wise identification scores. This matrix was applied to estimate the distance level for each pair of main spectra. A dendrogram was created according to the distance level between the *E. faecium* strains isolated from Tunisian "Dried Ossban" (**Figure 1A**) and with the *E. faecium* reference strains available in the Biotyper library (**Figure 1B**). This phyloproteomic analysis shows the hierarchical relationship between the five isolates and suggests that *E. faecium* MZF5 is more distant from the four other "Dried Ossban" strains.

Simultaneously, a PCR amplification with the *E. faecium* specific primers (EfmF1 5′-ACGGAGATCGTGGATTCAAA-3′ and EfmR1 5′-CGTACGGGAAGTGATTCGAC-3′) from Park et al. (2017) has been done and gave positive results. Indeed, as expected, a PCR product of 1032 bp was obtained, corresponding to the specific amplification of the M protein trans-acting positive regulator target gene of *E. faecium* (data not shown). Finally, 16S rRNA genes of the five *E. faecium* isolates (MZF1, MZF2, MZF3, MZF4 and MZF5) have been sequenced and the partial nucleotide sequences have been deposited in the NCBI Genbank under the accession numbers MH569603, MH569604, MH588167, MH591462, and MH591463, respectively.

Acid and Bile Salt Tolerance

The efficiency of a bacterium as a potential probiotic depends firmly on its aptitude to survive the passageway through the upper digestive tract to the intestine, where its beneficial effect is expected, and this represents a crucial requirement (Marteau et al., 1997; Tuomola et al., 2001). According to Maragkoudakis et al. (2006), the pH inside the human stomach ranges from 1 (during fasting) to 4.5 (after a meal), and food ingestion can take up to 3 h. Our findings indicated that the five isolates exhibited high tolerance to acidity after exposure to media pH 3 (**Table 3**) and were also tolerant to bile salts, since all of them survived successfully in MRS broth medium supplemented with 30 g/l bile salt, reflecting the physiological concentration of human bile (**Table 4**). Our results are in total accordance with data published by other authors for *Enterococcus* spp. isolated from food niches suggesting that these "Dried Ossban" strains could have the potential to reach the intestinal lumen and thus stay alive in that environment (Ahmadova et al., 2013; Gupta and Tiwari, 2015; Aspri et al., 2016).

Autoaggregation

According to the investigations of Collado et al. (2007), cell aggregation properties represent one of the most important phenotypic characteristics of a potential probiotic strain. In this study, the ability of the enterococcal strains, isolated from "Dried Ossban," to aggregate was evaluated. The results showed autoaggregation values ranged from 50 to 96% (**Figure 2**). MZF4 showed the lower level, 50%, whereas MZF2 and MZF1 showed the highest levels with 94 and 96%, respectively. These findings are supported by previous data demonstrating high values of autoaggregation for *E. faecium* strains (Dos Santos et al., 2015; Veljović et al., 2017). Autoaggregation proved to be strain-specific and may vary inside the same taxonomic group (Dos Santos et al., 2015). This strain specificity in autoaggregation has been reported in a study led by Todorov et al. (2008)

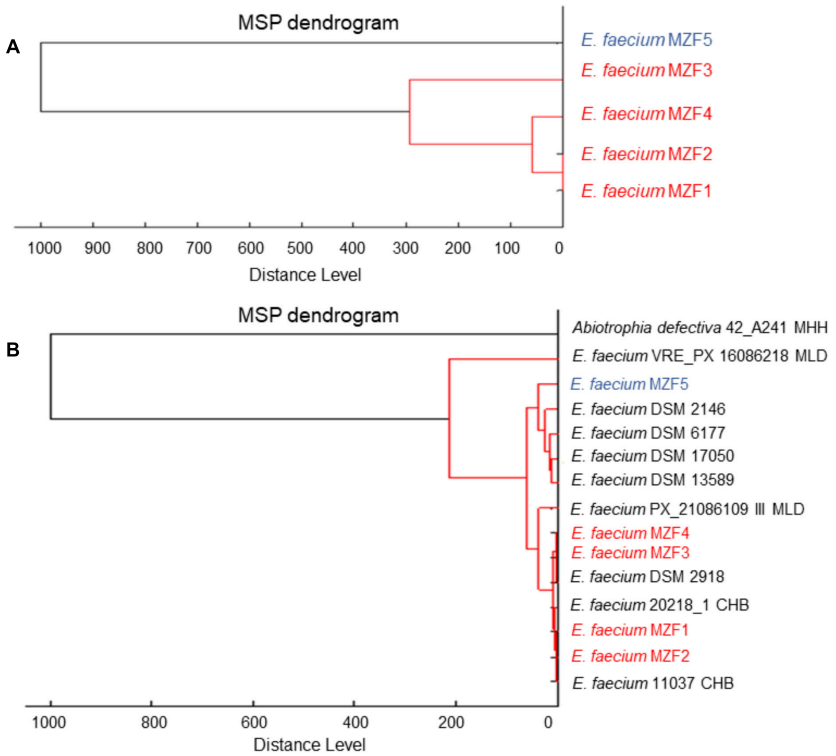


FIGURE 1 | MALDI-TOF MS based phylogenetic tree. **(A)** Distance level between the *E. faecium* strains isolated from Tunisian "Dried Ossban" and **(B)** distance level of the isolates compared to the *E. faecium* reference strains available in the Biotyper library.

TABLE 3 | Low pH and acidic conditions tolerance.

Isolates	Mean of viable count (log_{10} CFU/ml)			
	Time of exposure (h)			
	0	1	2	3
MZF1	6.71	6.46	6.50	6.47
MZF2	6.61	6.59	6.52	6.49
MZF3	7.02	6.89	6.61	6.57
MZF4	6.69	6.51	6.43	6.39
MZF5	7.09	6.92	6.79	6.67

TABLE 4 | Bile salts tolerance.

Isolates	Mean of viable count (log_{10} CFU/ml)			
	Time of exposure (h)			
	0	1	2	3
MZF1	6.67	6.59	6.54	6.51
MZF2	6.57	6.54	6.49	6.44
MZF3	7.01	6.74	6.62	6.50
MZF4	6.62	6.57	6.51	6.42
MZF5	7.04	6.76	6.59	6.54

for *Lactobacillus pentosus* ST712BZ and *Lactobacillus paracasei* ST284BZ. Bacterial autoaggregation is considered an important phenomenon in several ecological niches (Del Re et al., 2000). Among LAB, enterococcal species represent beneficial members of the microbiota residing the human and animal gastrointestinal and urogenital tracts (Bhardwaj et al., 2009). One beneficial feature of bacteria with autoaggregative potential is the ability to prevent the colonization of pathogenic bacteria via the formation of a barrier through autoaggregation to intestinal mucosa (Prince et al., 2012).

Adhesion Capacity

Saarela et al. (2000) demonstrated the importance of the adhesion step. Once the probiotic bacteria have reached the gut, the adhesion to the intestinal mucosa and epithelial cells represents a requirement step for colonization. Probiotics must adhere to the mucus layer to prevent being removed from the colon by peristalsis. To complete the study of the *E. faecium* isolated from "Dried Ossban," *in vitro* assessment of their adhesive potential to human colon adenocarcinoma epithelial cells (Caco-2/TC7 cell line) was conducted. **Figure 3** shows three isolates with very low adhesion percentages, 0.7, 0.9, and 1.4% for MZF1, MZF2, and MZF4, respectively. A moderate value is noticed with MZF3 isolates, 7.8% of adhesion, and the highest value is accorded to the MZF5 isolate with more than 21% of adhesive potential to Caco-2/TC7 cells. This agrees with other studies demonstrating strong adhesiveness for *E. faecium* BGGO9-28 (Veljović et al., 2017) and other LAB strains than Enterococcal species (Juntunen

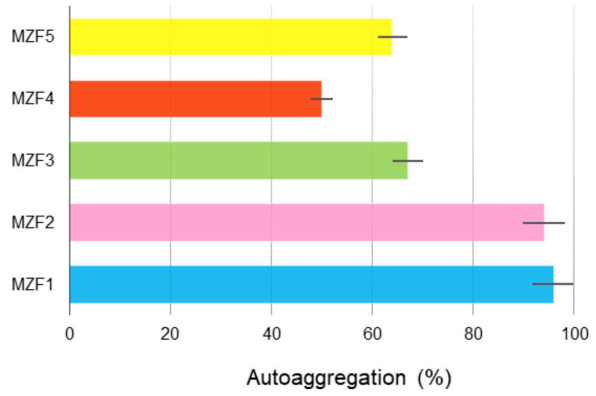


FIGURE 2 | Autoaggregation of the *E. faecium* strains isolated from "Dried Ossban." Data are expressed as mean ± SE.

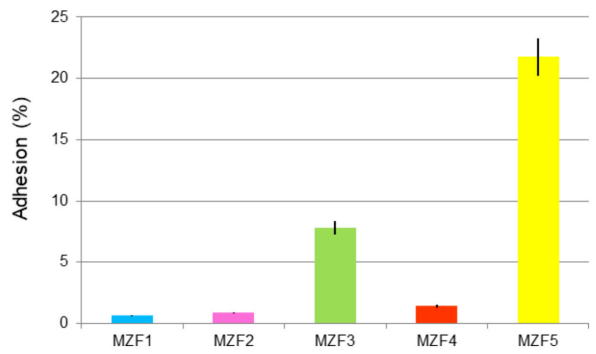


FIGURE 3 | Adhesion of the *E. faecium* isolates to the intestinal Caco-2/TC7 cells. Data are expressed as mean ± SE.

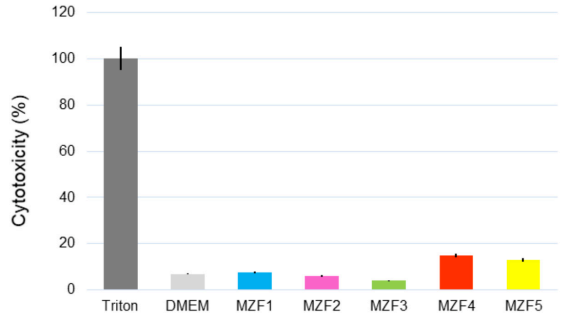


FIGURE 4 | Cytotoxicity of the *E. faecium* isolates measured by LDH release after overnight incubation of Caco-2/TC7 cells with 10^8 bacteria/ml. Data are expressed as mean ± SE.

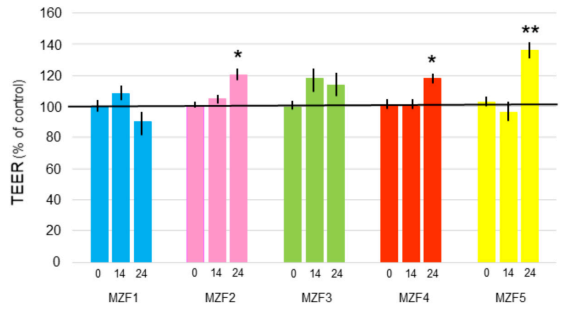


FIGURE 5 | TEER at time 0, 14, and 24 h of Caco-2/TC7 cells exposed to the *E. faecium* isolates (10^8 bacteria/ml). Data are expressed as percentages of the initial level measured in the insert and as a mean ± SE. $^*P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$ compared to Caco-2/TC7 control.

et al., 2001). Our findings showed a variability of results among the isolates. This is in line with Turpin et al. (2012) who reported that 30 LAB strains displayed adhesion capacities from 0.6 to 30.0% on the HT-29 cells. For the MZF5 isolate with 21.8% of adhesion capacity, this value was greater than that reported for the *E. faecalis* UGRA10 (Cebrián et al., 2012). It is significant to highlight that *in vitro* experiments have many restrictions, since adhesion properties and mucus production are strictly cell line-dependent in every single study (Turpin et al., 2012). *In vitro* test results using Caco-2 cells for the evaluation of adhesion ability to intestinal epithelium cells have been reported to have a good correlation with *in vivo* results (Crociani et al., 1995) and this characteristic is often strain-specific (Duary et al., 2011).

Cytotoxicity

As *E. faecium* contains concurrently harmless and pathogenic strains, a cytotoxicity assay was needed to ensure the safety of MZF1, MZF2, MZF3, MZF4, and MZF5. The five strains were applied overnight on Caco-2/TC7 monolayers and the cytotoxicity was estimated by measurement of LDH release and microscopic observation. Our findings showed that the weakest level of cytotoxicity is attributed to the MZF3 isolate with 4% of mortality, reflecting a high rate of viability, about 96%. This isolate exhibited no significant effect on the viability of Caco-2 cells compared to cells alone. MZF1 and MZF2 showed about 8 and 6% of cytotoxicity rate; 15 and 13% of the mortality was obtained with strains MZF4 and MZF5, respectively (**Figure 4**). These results are in harmony with previous studies showing that various probiotic bacteria had no cytotoxic effect on Caco-2 cells. For instance, Er et al. (2015) studied the cytotoxicity of three LAB (*Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, and *Weissella confusa*) on Caco-2 cells and showed dose-dependent cytotoxic effects of the cell-free filtrates and cell-free lyophilized filtrates of the three LAB. Similarly, a recent work performed by Castro et al. (2016) demonstrated that *E. faecalis* CECT7121 strain is not cytotoxic for Caco-2 cells.

Transepithelial Electric Resistance (TEER)

Measuring the TEER is a method for evaluating the intestinal barrier integrity *in vitro* (Schneeberger and Lynch, 2004). Results found for the effect of "Dried Ossban" isolates on Caco-2/TC7 monolayers are presented in **Figure 5**. After 24 h of incubation, MZF1 and MZF3 showed no significant impact on TEER, whereas MZF2 and MZF4 led to a slight 20% increase of TEER, and MZF5 a 30% increase. These findings

are in agreement with the results obtained for other well-known and characterized probiotics [*Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *E. coli* Nissle 1917, *Streptococcus thermophilus*, the probiotic complex VSL#3] on different cell lines (T84, HT29/cl.19A, and Caco-2) (Resta-Lenert and Barrett, 2003; Sherman et al., 2005; Ewaschuk et al., 2008). Indeed, it has been demonstrated that the application of probiotics on intestinal epithelial cells can give rise to two kinds of response. The first one was a significant enhancement of TEER values (Resta-Lenert and Barrett, 2003; Ewaschuk et al., 2008; Klingspor et al., 2015), while the other type of response was no effect on TEER measurements (Sherman et al., 2005). Furthermore, the effects were frequently showed to be dose- and time-dependent (Klingberg et al., 2005).

Virulence Factors

Virulence determinants greatly contribute to enhancing infection because of the risk of genetic transfer. Since these genes are usually located in conjugative plasmids (Eaton and Gasson, 2001), potential virulence genes of *E. faecium*, isolated from food sources, need to be assessed. Therefore, it seemed needful to test the five *E. faecium* isolates for their virulence factors profile (**Table 5**). Results showed that only the isolate MZF1 carried the *agg* gene, whereas *gelE* gene was detected in MZF1 and MZF4. The MZF2, MZF3, and MZF5 isolates do not harbor any of the tested virulence genes. Our findings are consistent with the data reported by Zheng et al. (2015), proving the absence of these virulence factors in food-isolated *E. faecium* strains, and with the study conducted by Eaton and Gasson (2001) who showed that the presence or absence of virulence factors is strain-specific. Indeed, Eaton and Gasson (2001) and Ahmadova et al. (2013) reported that a high frequency of the *esp* gene is only found in medical *E. faecium* strains. Besides, the presence of some virulence determinants such as *agg* and *gelE* genes in MZF1 and MZF4 cannot be considered as a negative trend since some commercial enterococci starter cultures with a long history of safe use are also known to possess several virulence genes such as *ace*, *asa1*, *gelE*, and *esp*. Moreover, Cebrián et al. (2012) and Popović et al. (2018) suggested that some virulence factors as the agg substance and the esp surface protein may play a beneficial role for probiotic bacteria. In fact, this may help the bacterium colonizing the gastrointestinal tract, and proliferating inside it, revealing its probiotic properties.

Histamine and Tyramine Production

The isolated DNA of the *E. faecium* strains was subjected to PCR amplification to detect the presence of histidine and tyrosine decarboxylase encoding genes (*hdc* and *tdc*, respectively). All the five strains showed the expected amplicon of 1100 bp corresponding to the *tdc* gene (**Figure 6**) but none harbored the histidine decarboxylase encoding gene, *hdc*. Our findings are in line with studies conducted by Inoğlu and Tuncer (2013), Ruiz et al. (2016), and Avci and Özden Tuncer (2017) where the authors found that all the analyzed *E. faecium* strains did not harbor the *hdc* gene but had the *tdc* gene. Histamine is the more toxic biogenic amine but the level of tyramine in food must also be controlled. A physiological assay showed that the five "Dried Ossban" strains were not, or weak producers of tyramine (data not shown). This will have to be confirmed later by a direct inoculation test of these bacteria in meat product.

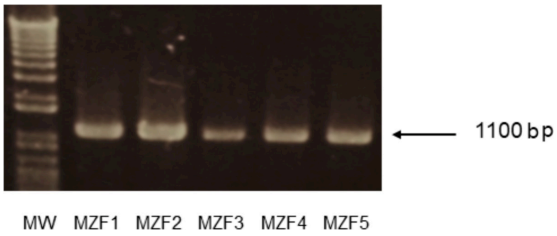


FIGURE 6 | PCR amplification of the tyrosine decarboxylase (*tdc*) gene in the five *E. faecium* strains isolated from "Dried Ossban" Molecular Weight marker (MW) 1 kB.

TABLE 5 | PCR results of virulence and antibiotic resistance genes.

E. faecium isolates	Genotype profile
MZF1	agg^{+} $gelE^{+}$ esp^{-} ace^{-} $vanA^{-}$ $vanB^{-}$
MZF2	agg^{-} $gelE^{-}$ esp^{-} ace^{-} $vanA^{-}$ $vanB^{-}$
MZF3	agg^{-} $gelE^{-}$ esp^{-} ace^{-} $vanA^{-}$ $vanB^{-}$
MZF4	agg^{-} $gelE^{+}$ esp^{-} ace^{-} $vanA^{-}$ $vanB^{-}$
MZF5	agg^{-} $gelE^{-}$ esp^{-} ace^{-} $vanA^{-}$ $vanB^{-}$

Antibiotic Susceptibility

Antibiotic resistance represents an essential issue in the safety evaluation of *Enterococcus* spp. Based on the broth microdilution procedure, all enterococci isolates showed sensitivity toward ampicillin and vancomycin (**Table 6**) which represent the commonly used antibiotics to treat enterococcal infections (Favaro et al., 2014). Vancomycin susceptibility was expected as PCR detection of the antibiotic resistance genes vanA and vanB gave negative results (**Table 5**). The five "Dried Ossban" strains were also sensitive to chloramphenicol, gentamicin, and tetracyclin, whereas they showed resistance to erythromycin (Macrolides) and ofloxacin (Quinolones).

The major criterion for the safety assessment of enterococci is their susceptibility to glycopeptides such as vancomycin. Fortunately, Franz et al. (2001) reported that vanA and vanB genes are rarely detected in enterococci isolates from food sources, which is in congruence with our results. Moreover, whereas many strains of *Enterococcus* are known to be intrinsically resistant to β-lactam antibiotics (de Fátima Silva Lopes et al., 2005), the five *E. faecium* isolated from "Dried Ossban" were sensitive to ampicillin. Concerning aminoglycosides, high rates of resistance have been previously noticed in enterococcal strains from dairy products (Hammad et al., 2015; Aspri et al., 2016). On the contrary, all the "Dried Ossban" isolates were sensitive to gentamicin. High levels of tetracycline resistance have been found previously in Enterococci from animal origin, and this may be due to the wide use of this antibiotic in husbandry activities (Busani et al., 2004). It is worth noting that on the contrary, the strains isolated from

TABLE 6 | Antibiotic susceptibility.

Antibiotic	MIC breakpoint recommendation of CLSI for *Enterococcus* spp. (μg/ml)			Strain/antibiotic susceptibility				
	S	I	R	MZF1	MZF2	MZF3	MZF4	MZF5
Ampicillin	≤8	–	≥16	<1 (S)	0.25 (S)	<0.125 (S)	<0.125 (S)	<0.125 (S)
Vancomycin	≤4	8–16	≥32	2 (S)	2 (S)	2 (S)	2 (S)	2 (S)
Ofloxacin	≤1	2	≥4	32(R)	32 (R)	16 (R)	32 (R)	32 (R)
Gentamicin	≤500	N/A	≥500	128 (S)	128 (S)	256 (S)	256 (S)	256 (S)
Erythromycin	≤0.5	1–4	≥8	8 (R)	8 (R)	4 (I)	16 (R)	16 (R)
Chloramphenicol	≤8	16	≥32	2 (S)	8 (S)	4 (S)	4 (S)	4 (S)
Tetracyclin	≤4	8	≥16	<1(S)	<1(S)	<1 (S)	<1(S)	<1 (S)

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute; MIC, minimal inhibitory concentration; N/A, not applicable; R, resistant; S, susceptible.

TABLE 7 | Analysis for enterocins A, B, and P genes and antibacterial activity.

	MZF1	MZF2	MZF3	MZF4	MZF5
Bacteriocin genes					
Enterocin A (*EntA*)	+	+	–	+	+
Enterocin B (*EntB*)	+	+	+	+	+
Enterocin P (*EntP*)	+	+	–	+	+
Antibacterial activity					
Listeria innocua HPB13	+++	+++	+	+++	+++
Enterococcus faecalis ATCC 29212	+++	+	–	++	+++
Staphylococcus aureus ATCC 25923	–	–	–	–	–
Escherichia coli DH5α	–	–	–	–	–
Pseudomonas aeruginosa PAO1	–	–	–	–	–
Salmonella typhimurium ATCC 14028	–	–	–	–	–

–, Absence of activity; +, weak activity; ++, moderate activity; +++, high activity.

"Dried Ossban" were all sensitive to tetracycline. These bacteria were also sensitive to chloramphenicol, and this is in harmony with previous studies (Zheng et al., 2015; Aspri et al., 2016). Conversely, a high rate of erythromycin resistance was detected among the "Dried Ossban" Enterococci, 80% (4/5 isolates) and the remaining 20% (1/5 isolates) were classified as intermediate. Macrolides are frequently used in animal husbandry; this could contribute to the emergence of many resistant strains (Diarra et al., 2010).

For safety reasons, a critical criterion for *Enterococcus* to be used in foods is the lack of transferable antibiotic resistance (Cebrián et al., 2012). All the isolates in this study showed sensitive traits to five antibiotics.

Detection of Bacteriocin Structural Genes by PCR

Numerous studies have reported the potential of several enterococcal species such as *Enterococcus mundtii*, *E. faecium*, and *E. faecalis* to produce bacteriocins, also known as enterocins, highly active against sturdy spoilage and pathogenic microorganisms in foods and food products, such as *Listeria* spp. (Favaro et al., 2014). Most of these enterocins have been genetically characterized; it seems that most of them are class II bacteriocins, heat stable, cationic, hydrophobic, and low molecular weight peptides. The classification of enterocins includes four main classes. Class II is subdivided into three subclasses: the pediocin family of enterocins such as enterocin A and enterocin P (IIa) with strong anti-listerial effects, bacteriocins synthesized without a leader peptide such as enterocin L50 A and B (IIb), linear enterocins that do not belong to the pediocin family (IIc) and the class (IId) including enterocin B (Aymerich et al., 1996; Casaus et al., 1997; Franz et al., 2007). Bacteriocin production is being increasingly considered as an important criterion in the selection of a probiotic strain (Dobson et al., 2012; Hegarty et al., 2016). In our study, MZF1, MZF2, MZF4, and MZF5 have been shown to be highly active against *L. innocua* HPB13 (**Table 7**). These isolates were found to harbor the *EntA*, *EntB*, and *EntP* genes, whereas the MZF3 isolate has been shown carrying out only the *EntB* gene with a weak activity against *L. innocua* HPB13. Similarly, Strompfová et al. (2008) found the presence of a combination of the three structural genes *EntA*, *EntB*, and *EntP* in various food matrices including French and Slovak meat products. Other results are also in agreement with our findings showing the presence of the combination of these three enterocin genes in *E. faecium* strains from food and clinical sources (De Vuyst et al., 2003; Ogaki et al., 2016).

However, all the five *E. faecium* isolates displayed no inhibition of the reference strain *S. aureus* ATCC 25923, neither against the Gram-negative indicator bacteria used in this study. Besides, they showed inhibitory potential, strain-dependent, against *E. faecalis*

ATCC 29212 except for MZF3 that showed no activity against this indicator strain. All the results of antibacterial activity are summarized in **Table 7**.

In our investigation, preliminary treatments on culture-free supernatant (CFS) have been applied in purpose to determine the nature of the antimicrobial compound. The activity of the inhibitory substance was retained in the presence of catalase indicating that the microbial inhibition is not due to H_2O_2, but not in the presence of proteinase K, reflecting the proteinaceous nature of the antimicrobial substance, also known as bacteriocin which is in our case an enterocin.

CONCLUSION

To our knowledge, this is the first report on the study of *E. faecium* isolated from a Tunisian artisanal biotope called "Dried Ossban." The outcomes of this work claim that enterococcal isolates are resistant against the harsh gastrointestinal conditions (acidity and bile salts). The safety assessment revealed that these bacteria were susceptible to clinically relevant antibiotics such as vancomycin. They do not have the capacity to produce histamine, the more toxic biogenic amine, and most of the *E. faecium* strains do not harbor the virulence genes for *agg*, *gelE*, *esp*, and *ace*. Conversely, all the isolates possess at least one enterocin and could efficiently inhibit the growth of *Listeria* spp. These results showed that these strains, in particular MZF5, according to its high adhesion capacity, absence of cytotoxicity and virulence genes, may be considered as interesting candidates for future use as probiotics and bioprotective cultures for application in the food and/or feed industries. Further tests will be needed to evaluate their technological characteristics and behavior in meat products.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MZ carried out most of the experimental work, interpreted the data, and wrote the manuscript. MC and OM contributed to the PCR assays. MB helped with the identification of bacteria by MALDI-TOF MS. MOF and NC designed and supervised the entire project. All authors edited the manuscript, read and approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

MZ is recipient of a Tunisian grant. This work was supported by Évreux Porte de Normandie, Region Normandie and European Union (FEDER), and by Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

REFERENCES

Ahmadova, A., Todorov, S. D., Choiset, Y., Rabesona, H., Zad, T. M., Kuliyev, A., et al. (2013). Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control* 30, 631–641. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.08.009

Anandharaj, M., Sivasankari, B., Santhanakaruppu, R., Manimaran, M., Rani, R. P., and Sivakumar, S. (2015). Determining the probiotic potential of cholesterol-reducing *Lactobacillus* and *Weissella* strains isolated from gherkins (fermented cucumber) and south Indian fermented koozh. *Res. Microbiol.* 166, 428–439. doi: 10.1016/j.resmic.2015.03.002

Arias, C. A., and Murray, B. E. (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 266–278. doi: 10.1038/nrmicro2761

Aspri, M., Bozoudi, D., Tsaltas, D., Hill, C., and Papademas, P. (2016). Raw donkey milk as a source of *Enterococcus* diversity: assessment of their technological properties and safety characteristics. *Food Control* 73, 81–90. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.05.022

Avci, M., and Özden Tuncer, B. (2017). Safety evaluation of enterocin producer *Enterococcus* sp. Strains isolated from traditional Turkish cheeses. *Pol. J. Microbiol.* 66, 223–233. doi: 10.5604/01.3001.0010.7839

Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L. S., Hugas, M., Garriga, M., and Nes, I. F. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1676–1682.

Bennik, M. H., Vanloo, B., Brasseur, R., Gorris, L. G., and Smid, E. J. (1998). A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1373, 47–58. doi: 10.1016/S0005-2736(98)00086-8

Bhardwaj, A., Kapila, S., Mani, J., and Malik, R. K. (2009). Comparison of susceptibility to opsonic killing by *in vitro* human immune response of *Enterococcus* strains isolated from dairy products, clinical samples and probiotic preparation. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 513–515. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.010

Björkroth, J., Ristiniemi, M., Vandamme, P., and Korkeala, H. (2005). *Enterococcus* species dominating in fresh modified-atmosphere-packaged, marinated broiler legs are overgrown by *Carnobacterium* and *Lactobacillus* species during storage at 6°C. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 267–276. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.011

Busani, L., Del Grosso, M., Paladini, C., Graziani, C., Pantosti, A., Biavasco, F., et al. (2004). Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 17–22. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.008

Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., and Harwood, V. J. (2012). Enterococci in the environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 685–706. doi: 10.1128/MMBR.00023-12

Bybee, S. N., Scorza, A. V., and Lappin, M. R. (2011). Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on presence of diarrhea in cats and dogs housed in an animal shelter. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 856–860. doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.0738.x

Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L. M., Nes, I. F., Hernández, P. E., and Holo, H. (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143, 2287–2294. doi: 10.1099/00221287-143-7-2287

Castro, M. S., Molina, M. A., Azpiroz, M. B., Díaz, A. M., Ponzio, R., Sparo, M. D., et al. (2016). Probiotic activity of *Enterococcus faecalis* CECT7121: effects on mucosal immunity and intestinal epithelial cells. *J. Appl. Microbiol.* 121, 1117–1129. doi: 10.1111/jam.13226

Cebrián, R., Baños, A., Valdivia, E., Pérez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M., and Maqueda, M. (2012). Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiol.* 30, 59–67. doi: 10.1016/j.fm.2011.12.002

Chanos, P., and Williams, D. R. (2011). Anti-*Listeria* bacteriocin-producing bacteria from raw ewe's milk in northern Greece. *J. Appl. Microbiol.* 110, 757–768. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04932.x

Christoffersen, T. E., Jensen, H., Kleiveland, C. R., Dorum, G., Jacobsen, M., and Lea, T. (2012). *In vitro* comparison of commensal, probiotic and pathogenic

strains of *Enterococcus faecalis*. *Br. J. Nutr.* 108, 2043–2053. doi: 10.1017/S0007114512000220

Cintas, L. M., Rodríguez, J. M., Fernández, M. F., Sletten, K., Nes, I. F., Hernández, P. E., et al. (1995). Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2643–2648.

Clark, N. C., Cooksey, R. C., Hill, B. C., Swenson, J. M., and Tenover, F. C. (1993). Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from US hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 2311–2317. doi: 10.1128/AAC.37.11.2311

CLSI (2015). *M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement*. Wayne, PA: CLSI.

Collado, M. C., Meriluoto, J., and Salminen, S. (2007). Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: *in vitro* evaluation of different methods. *J. Microbiol. Methods* 71, 71–74. doi: 10.1016/j.mimet.2007.07.005

Collado, M. C., Meriluoto, J., and Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 1065–1073. doi: 10.1007/s00217-007-0632-x

Connil, N., Le Breton, Y., Dousset, X., Auffray, Y., Rincé, A., and Prévost, H. (2002). Identification of the *Enterococcus faecalis* tyrosine decarboxylase operon involved in tyramine production. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3537–3544. doi: 10.1128/AEM.68.7.3537-3544.2002

Crociani, J., Grill, J. P., Huppert, M., and Ballongue, J. (1995). Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with *in vivo* study. *Lett. Appl. Microbiol.* 21, 146–148. doi: 10.1111/j.1472-765X.1995.tb01027.x

de Fátima Silva Lopes, M., Ribeiro, T., Abrantes, M., Figueiredo Marques, J. J., Tenreiro, R., and Crespo, M. T. B. (2005). Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 191–198. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.025

De Vuyst, L., Foulquié Moreno, M. R., and Revets, H. (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 299–318. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00425-7

Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., and Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 438–442. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x

Diarra, M. S., Rempel, H., Champagne, J., Masson, L., Pritchard, J., and Topp, E. (2010). Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. and characterization of isolates from broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 8033–8043. doi: 10.1128/AEM.01545-10

Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., and Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1–6. doi: 10.1128/AEM.05576-11

Dos Santos, K. M., Vieira, A. D., Salles, H. O., Oliveira Jda, S., Rocha, C. R., Borges Mde, F., et al. (2015). Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses. *Braz. J. Microbiol.* 46, 237–249. doi: 10.1590/S1517-838246120131245

Du Toit, M., Franz, C. M., Dicks, L. M., and Holzapfel, W. H. (2000). Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *J. Appl. Microbiol.* 88, 482–494. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00986.x

Duary, R. K., Rajput, Y. S., Batish, V. K., and Grover, S. (2011). Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *Ind. J. Med. Res.* 134, 664–671. doi: 10.4103/0971-5916.90992

Duprè, I., Zanetti, S., Schito, A. M., Fadda, G., and Sechi, L. A. (2003). Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J. Med. Microbiol.* 52, 491–498. doi: 10.1099/jmm.0.05038-0

Eaton, T. J., and Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1628–1635. doi: 10.1128/AEM.67.4.1628-1635.2001

Elbehiry, A., Marzouk, E., Hamada, M., Al-Dubaib, M., Alyamani, E., Moussa, I. M., et al. (2017). Application of MALDI-TOF MS fingerprinting as a quick tool for identification and clustering of foodborne pathogens isolated from food products. *New Microbiol.* 40, 269–278.

Er, S., Koparal, A. T., and Kivanc, M. (2015). Cytotoxic effects of various lactic acid bacteria on Caco-2 cells. *Turk. J. Biol.* 39, 23–30. doi: 10.3906/biy-1402-62

Ewaschuk, J. B., Diaz, H., Meddings, L., Diederichs, B., Dmytrash, A., Backer, J., et al. (2008). Secreted bioactive factors from Bifidobacterium infantis enhance epithelial cell barrier function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 295, G1025–G1034. doi: 10.1152/ajpgi.90227.2008

Favaro, L., Basaglia, M., Casella, S., Hue, I., Dousset, X., Gombossy de Melo Franco, B. D., et al. (2014). Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. *Food Microbiol.* 38, 228–239. doi: 10.1016/j.fm.2013.09.008

Fisher, K., and Phillips, P. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155, 1749–1757. doi: 10.1099/mic.0.026385-0

Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., and De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 1–24. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026

Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., and Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 125–140. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014

Franz, C. M., Muscholl-Silberhorn, A. B., Yousif, N. M., Vancanneyt, M., Swings, J., and Holzapfel, W. H. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4385–4389. doi: 10.1128/AEM.67.9.4385-4389.2001

Franz, C. M., van Belkum, M. J., Holzapfel, W. H., Abriouel, H., and Gálvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 293–310. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00064.x

Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Quesada, A., and Montoya, E. (1986). Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Can. J. Microbiol.* 32, 765–771. doi: 10.1139/m86-141

Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 215–222. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00183-1

Gupta, A., and Tiwari, S. K. (2015). Probiotic potential of bacteriocin-producing *Enterococcus hirae* strain LD3 isolated from dosa batter. *Ann. Microbiol.* 65, 2333–2342. doi: 10.1007/s13213-015-1075-4

Hadji-Sfaxi, I., El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Batdorj, B., Le Blay, G., Barbier, G., et al. (2011). Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4.1 isolated from Mongol yogurt. *Food Control* 22, 2020–2027. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.05.023

Hammad, A. M., Hassan, H. A., and Shimamoto, T. (2015). Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. *Food Control* 50, 815–820. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.10.020

Hegarty, J. W., Guinane, C. M., Ross, R. P., Hill, C., and Cotter, P. D. (2016). Bacteriocin production: a relatively unharnessed probiotic trait? *F1000Res.* 5:2587. doi: 10.12688/f1000research.9615.1

Hillion, M., Mijouin, L., Jaouen, T., Barreau, M., Meunier, P., Lefeuvre, L., et al. (2013). Comparative study of normal and sensitive skin aerobic bacterial populations. *Microbiologyopen* 2, 953–961. doi: 10.1002/mbo3.138

Inoğlu, Z. N., and Tuncer, Y. (2013). Safety assessment of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from Turkish Tulum Cheese. *J. Food Saf.* 33, 369–377. doi: 10.1111/jfs.12061

Jacobsen, C. N., Nielsen, V., Hayford, A. E., Møller, P. L., Michaelsen, K. F., et al. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4949–4956.

Juntunen, M., Kirjavainen, P. V., Ouwehand, A. C., Salminen, S. J., and Isolauri, E. (2001). Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2, 293–296. doi: 10.1128/CDLI.8.2.293-296.2001

Khalkhali, S., and Mojgani, N. (2017). Bacteriocinogenic potential and virulence traits of *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* isolated from human milk. *Iran. J. Microbiol.* 9, 224–233.

Klingberg, T. D., Pedersen, M. H., Cencic, A., and Budde, B. B. (2005). Application of measurements of transepithelial electrical resistance of intestinal epithelial cell monolayers to evaluate probiotic activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7528–7530. doi: 10.1128/AEM.71.11.7528-7530.2005

Klingspor, S., Bondzio, A., Martens, H., Aschenbach, J. R., Bratz, K., Tedin, K., et al. (2015). *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 modulates epithelial integrity, heat shock protein, and proinflammatory cytokine response in intestinal cells. *Mediators Inflamm.* 2015:304149. doi: 10.1155/2015/304149

Ladero, V., Fernández, M., Calles-Enríquez, M., Sánchez-Llana, E., Cañedo, E., Martín, M. C., et al. (2012). Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci? *Food Microbiol.* 30, 132–138. doi: 10.1016/j.fm.2011.12.016

Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Duprè, I., et al. (2003). Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 291–304. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00191-0

Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., and Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Int. Dairy J.* 16, 189–199. doi: 10.1016/j.idairyj.2005.02.009

Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R., and Huis in't Veld, J. H. J. (1997). Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J. Dairy Sci.* 80, 1031–1037. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76027-2

Messaoudi, S., Madi, A., Prévost, H., Feuilloley, M., Manai, M., Dousset, X., et al. (2012). *In vitro* evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Anaerobe* 18, 584–589. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.10.004

Murray, B. E. (1990). The life and times of the Enterococcus. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 46–65. doi: 10.1128/CMR.3.1.46

Ogaki, M. B., Rocha, K. R., Terra, M. R., Furlaneto, M. C., and Maia, L. F. (2016). Screening of the enterocin-encoding genes and antimicrobial activity in *Enterococcus* species. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26:10261034. doi: 10.4014/jmb.1509.09020

Ogier, J. C., and Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 291–301. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.017

Park, J., Jin, G. D., Pak, J. I., Won, J., and Kim, E. B. (2017). Development of a rapid identification method for the differentiation of *Enterococcus* species using a species-specific multiplex PCR based on comparative genomics. *Curr. Microbiol.* 74, 476–483. doi: 10.1007/s00284-017-1210-5

Popović, N., Dinić, M., Tolinaèki, M., Mihajlović, S., Terzić-Vidojević, A., Bojić, S., et al. (2018). New insight into biofilm formation ability, the presence of virulence genes and probiotic potential of *Enterococcus* sp. dairy isolates. *Front. Microbiol.* 9:78. doi: 10.3389/fmicb.2018.00078

Prince, T., McBain, A. J., and O'Neill, C. A. (2012). *Lactobacillus reuteri* protects epidermal keratinocytes from *Staphylococcus aureus*-induced cell death by competitive exclusion. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5119–5126. doi: 10.1128/AEM.00595-12

Resta-Lenert, S., and Barrett, K. E. (2003). Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC)". *Gut* 52, 988–997. doi: 10.1136/gut.52.7.988

Reviriego, C., Eaton, T., Martin, R., Jimenez, E., Fernandez, L., Gasson, M. J., et al. (2005). Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *J. Hum. Lact.* 21, 131–138. doi: 10.1177/0890334405275394

Rosenthal, V. D., Maki, D. G., Mehta, A., Alvarez-Moreno, C., Leblebicioglu, H., Higuera, F., et al. (2008). International nosocomial infection control consortium members 2002–2007. *Am. J. Infect. Control* 36, 627–637. doi: 10.1016/j.ajic.2008.03.003

Ruiz, P., Pérez-Martín, F., Seseña, S., and Llanos Palop, M. (2016). Seasonal diversity and safety evaluation of enterococci population from goat milk in a farm. *Dairy Sci. Technol.* 96, 359–375. doi: 10.1007/s13594-015-0273-y

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., and Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84, 197–215. doi: 10.1016/S0168-1656(00)00375-8

Satish Kumar, R., Kanmani, P., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V., and Arul, V. (2011). Purification and characterization of enterocin MC13 produced by a potential aquaculture probiont *Enterococcus faecium* MC13 isolated from the gut of *Mugil cephalus*. *Can. J. Microbiol.* 57, 993–1001. doi: 10.1139/w11-092

Schaberg, D. R., Culver, D. H., and Gaynes, R. P. (1991). Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am. J. Med.* 91, 72S–75S. doi: 10.1016/0002-9343(91)90346-Y

Schneeberger, E. E., and Lynch, R. D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286, C1213–C1228. doi: 10.1152/ajpcell.00558.2003

Sherman, P. M., Johnson-Henry, K. C., Yeung, H. P., Ngo, P. S., Goulet, J., and Tompkins, T. A. (2005). Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infect. Immun.* 73, 5183–5188. doi: 10.1128/IAI.73.8.5183-5188.2005

Sogawa, K., Watanabe, M., Sato, K., Segawa, S., Ishii, C., Miyabe, A., et al. (2011). Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 1905–1911. doi: 10.1007/s00216-011-4877-7

Strompfová, V., Lauková, A., Simonová, M., and Marcináková, M. (2008). Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. *Vet. Microbiol.* 132, 293–301. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.05.001

Todorov, S. D., Botes, M., Guigas, C., Schillinger, U., Wiid, I., Wachsman, M. B., et al. (2008). Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 104, 465–477. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03558.x

Todorov, S. D., Wachsman, M., Tomé, E., Dousset, X., Destro, M. T., Milner, L., et al. (2010). Characterisation of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *Food Microbiol.* 27, 869–879. doi: 10.1016/j.fm.2010.05.001

Todorov, S. D., Wachsman, M. B., Knoetze, H., Meincken, M., and Dicks, L. M. T. (2005). An antibacterial and antiviral peptide produced by *Enterococcus mundtii* ST4 V isolated from soya beans. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25, 508–513. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.02.005

Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E., and Salminen, S. (2001). Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 393s–398s. doi: 10.1093/ajcn/73.2.393s

Turpin, W., Humbolt, C., Noordine, M. L., Thomas, M., and Guyot, J. P. (2012). *Lactobacillaceae* and cell adhesion: genomic and functional screening. *PLoS One* 7:e38034. doi: 10.1371/journal.pone.0038034

Veljović, K., Popović, N., Miljković, M., Tolinaèki, M., Terzić-Vidojević, A., and Kojić, M. (2017). Novel aggregation promoting factor AggE contributes to the probiotic properties of *Enterococcus faecium* BGGO9-28. *Front. Microbiol.* 8:1843. doi: 10.3389/fmicb.2017.01843

Wieckowicz, M., Schmidt, M., Sip, A., and Graje, W. (2011). Development of a PCR-based assay for rapid detection of class IIa bacteriocin genes. *Lett. Appl. Microbiol.* 52, 281–289. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02999.x

Yamaguchi, T., Miura, Y., and Matsumoto, T. (2013). Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* strains used in clinical practice as probiotics. *J. Infect. Chemother.* 19, 1109–1115. doi: 10.1007/s10156-013-0633-6

Yanagida, F., Chen, Y., Onda, T., and Shinohara, T. (2005). Durancin L28-1A, a new bacteriocin from *Enterococcus durans* L28- 1, isolated from soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 430–435. doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01693.x

Zheng, W., Zhang, Y., Lu, H. M., Li, D. T., Zhang, Z. L., Tang, Z. X., et al. (2015). Antimicrobial activity and safety evaluation of *Enterococcus faecium* KQ 2.6 isolated from peacock feces. *BMC Biotechnol.* 15:30. doi: 10.1186/s12896-015-0151-y

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Zommiti, Cambronel, Maillot, Barreau, Sebei, Feuilloley, Ferchichi and Connil. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Article en co-auteurs

frontiers in Microbiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 24 April 2019
doi: 10.3389/fmicb.2019.00881

Probiotic Potential and Safety Evaluation of *Enterococcus faecalis* OB14 and OB15, Isolated From Traditional Tunisian Testouri Cheese and Rigouta, Using Physiological and Genomic Analysis

Olfa Baccouri[1], Amine Mohamed Boukerb[2], Leila Ben Farhat[1], Arthur Zébré[2], Kurt Zimmermann[3], Eugen Domann[4], Mélyssa Cambronel[2], Magalie Barreau[2], Olivier Maillot[2], Isabelle Rincé[5], Cécile Muller[5], Mohamed Nejib Marzouki[1], Marc Feuilloley[2], Ferid Abidi[1†] and Nathalie Connil[2†]*

[1] Laboratory of Protein Engineering and Bioactive Molecules (LIP-MB), National Institute of Applied Sciences and Technology, University of Carthage, Tunis, Tunisia, [2] Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) EA 4312, Normandie Université – Université de Rouen, Évreux, France, [3] SymbioPharm GmbH, Herborn, Germany, [4] Institute of Medical Microbiology, German Centre for Infection Research, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany, [5] UNICAEN, U2RM, Normandie Université, Caen, France

Lactic acid bacteria (LAB) strains OB14 and OB15 were isolated from traditional Tunisian fermented dairy products, Testouri cheese and Rigouta, respectively. They were identified as *Enterococcus faecalis* by the MALDI TOF-MS (matrix assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry) biotyper system and molecular assays (species-specific PCR). These new isolates were evaluated for probiotic properties, compared to *E. faecalis* Symbioflor 1 clone DSM 16431, as reference. The bacteria were found to be tolerant to the harsh conditions of the gastrointestinal tract (acidity and bile salt). They were low to moderate biofilm producers, can adhere to Caco-2/TC7 intestinal cells and strengthen the intestinal barrier through the increase of the transepithelial electrical resistance (TER). Susceptibility to ampicillin, vancomycin, gentamicin and erythromycin has been tested using the broth microdilutions method. The results demonstrated that *E. faecalis* OB14 and OB15 were sensitive to the clinically important ampicillin (MIC = 1 μg/mL) and vancomycin (MIC = 2 μg/mL) antibiotics. However, Whole Genome Sequencing (WGS) showed the presence of tetracycline resistance and cytolysin genes in *E. faecalis* OB14, and this led to high mortality of *Galleria Mellonella* larvae in the virulence test. Hierarchical cluster analysis by MALDI TOF-MS biotyper showed that *E. faecalis* OB15 was closely related to the *E. faecalis* Symbioflor 1 probiotic strain than to OB14, and this has been confirmed by WGS using the average nucleotide identity (ANI) and Genome-to-Genome Hybridization similarity methods. According to these results, *E. faecalis* OB15 seems to be reliable for future development as probiotic, in food or feed industry.

Keywords: Testouri cheese, Rigouta, *Enterococcus faecalis*, probiotics, antibiotic resistance, genomic analysis, virulence, safety

Ma contribution à ces travaux à consister à réaliser des analyses PCR afin de rechercher la présence des gènes codant les facteurs de virulence majeurs chez *E. faecalis*.

frontiers in Microbiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 24 April 2019
doi: 10.3389/fmicb.2019.00881

Probiotic Potential and Safety Evaluation of *Enterococcus faecalis* OB14 and OB15, Isolated From Traditional Tunisian Testouri Cheese and Rigouta, Using Physiological and Genomic Analysis

Olfa Baccouri[1], Amine Mohamed Boukerb[2], Leila Ben Farhat[1], Arthur Zébré[2], Kurt Zimmermann[3], Eugen Domann[4], Mélyssa Cambronel[2], Magalie Barreau[2], Olivier Maillot[2], Isabelle Rincé[5], Cécile Muller[5], Mohamed Nejib Marzouki[1], Marc Feuilloley[2], Ferid Abidi[1†] and Nathalie Connil[2*†]

[1] Laboratory of Protein Engineering and Bioactive Molecules (LIP-MB), National Institute of Applied Sciences and Technology, University of Carthage, Tunis, Tunisia, [2] Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) EA 4312, Normandie Université – Université de Rouen, Évreux, France, [3] SymbioPharm GmbH, Herborn, Germany, [4] Institute of Medical Microbiology, German Centre for Infection Research, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany, [5] UNICAEN, U2RM, Normandie Université, Caen, France

Lactic acid bacteria (LAB) strains OB14 and OB15 were isolated from traditional Tunisian fermented dairy products, Testouri cheese and Rigouta, respectively. They were identified as *Enterococcus faecalis* by the MALDI TOF-MS (matrix assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry) biotyper system and molecular assays (species-specific PCR). These new isolates were evaluated for probiotic properties, compared to *E. faecalis* Symbioflor 1 clone DSM 16431, as reference. The bacteria were found to be tolerant to the harsh conditions of the gastrointestinal tract (acidity and bile salt). They were low to moderate biofilm producers, can adhere to Caco-2/TC7 intestinal cells and strengthen the intestinal barrier through the increase of the transepithelial electrical resistance (TER). Susceptibility to ampicillin, vancomycin, gentamicin and erythromycin has been tested using the broth microdilutions method. The results demonstrated that *E. faecalis* OB14 and OB15 were sensitive to the clinically important ampicillin (MIC = 1 μg/mL) and vancomycin (MIC = 2 μg/mL) antibiotics. However, Whole Genome Sequencing (WGS) showed the presence of tetracycline resistance and cytolysin genes in *E. faecalis* OB14, and this led to high mortality of *Galleria Mellonella* larvae in the virulence test. Hierarchical cluster analysis by MALDI TOF-MS biotyper showed that *E. faecalis* OB15 was closely related to the *E. faecalis* Symbioflor 1 probiotic strain than to OB14, and this has been confirmed by WGS using the average nucleotide identity (ANI) and Genome-to-Genome Hybridization similarity methods. According to these results, *E. faecalis* OB15 seems to be reliable for future development as probiotic, in food or feed industry.

Keywords: Testouri cheese, Rigouta, *Enterococcus faecalis*, probiotics, antibiotic resistance, genomic analysis, virulence, safety

OPEN ACCESS

Edited by:
Teresa Zotta, Italian National Research Council (CNR), Italy

Reviewed by:
Christian Magni, CONICET Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), Argentina
Jeverson Frazzon, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil
Monica Sparo, National University of Central Buenos Aires, Argentina

***Correspondence:**
Nathalie Connil
nathalie.connil@univ-rouen.fr

† These authors have equitably contributed to the supervision of this work

Specialty section:
This article was submitted to Food Microbiology, a section of the journal Frontiers in Microbiology

Received: *05 January 2019*
Accepted: *05 April 2019*
Published: *24 April 2019*

Citation:
Baccouri O, Boukerb AM, Farhat LB, Zébré A, Zimmermann K, Domann E, Cambronel M, Barreau M, Maillot O, Rincé I, Muller C, Marzouki MN, Feuilloley M, Abidi F and Connil N (2019) Probiotic Potential and Safety Evaluation of Enterococcus faecalis OB14 and OB15, Isolated From Traditional Tunisian Testouri Cheese and Rigouta, Using Physiological and Genomic Analysis. Front. Microbiol. 10:881. doi: 10.3389/fmicb.2019.00881

INTRODUCTION

Enterococci are normal inhabitants of the gastrointestinal tract of humans and animals. These bacteria are ubiquitous in nature and have been used in the food industry as probiotics (Franz et al., 2003), or as starter culture in manufacturing cheese in high salt content and low pH (Wessels et al., 1991). They contribute to the characteristic taste of traditional Mediterranean cheeses and can be present in other fermented foods such as sausages, olives, and vegetables. Some strains have been proposed for food preservation, as they produce bacteriocins (enterocins), antimicrobial peptides with the potential to inhibit the growth of food-borne pathogenic and spoilage bacteria (Khan et al., 2010; Franz et al., 2011). Recently, bacteriocins have been suggested as a new probiotic trait when selecting beneficial microbes. Most of the enterocins belong to Class-II bacteriocins, including the pediocin family of enterocins highly active against *Listeria* spp (Ness et al., 2014). Some enterococci strains produce simultaneously several bacteriocins, which give them a competitive advantage toward other microbes for colonization and niche control (Hanchi et al., 2018).

While the genus *Enterococcus* includes many species, only few have been studied to be used as probiotics, such as *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. lactis* and more recently *E. hirae* (Adnan et al., 2017) and *E. durans* (Li et al., 2018). For example, some *Enterococcus* strains are currently in use as therapeutic treatments, marketed as Cylactins (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland), Fargo 688s (Quest International, Naarden, Netherlands), ECOFLOR (Walthers Health Care, DenHaag, Netherlands), or Symbioflor 1 (SymbioPharm, Herborn, Germany), to alleviate the symptoms of irritable bowel syndrome and recurrent chronic sinusitis or bronchitis (Franz et al., 2003; Foulquié Moreno et al., 2006). The probiotic *E. faecalis* Symbioflor 1 clone DSM 16431, originally isolated in the 1950s from the stool sample of a healthy human adult, has been used as a probiotic for more than 50 years without any report or documentation of any infection or adverse effect. The complete genome sequence of this strain has been determined and several toxicological studies showed that the strain can be administred safely to humans (Domann et al., 2007; Christoffersen et al., 2012; Fritzenwanker et al., 2013). However, according to FDA, probiotic shall be used carefully by populations at risk, for example those with immune compromise, premature infants, patients suffering from various pathologies. . .

On the other hand, some enterococci are known to be opportunistic pathogens and are a prevalent cause of nosocomial infections. These bacteria have been implicated in bacteraemia, endocarditis, urinary tract infections or other infections. Recently, a role of *E. faecalis* in pancreatic and colorectal cancers has also been suggested but this remains controversial (De Almeida et al., 2018; Maekawa et al., 2018). One factor which contributes to the pathogenicity of *E. faecalis*, is the resistance of many strains to a broad range of antibiotics (Franz et al., 2003). This antibiotic resistance is due to intrinsic and/or acquired genes located on the chromosome, or on mobile elements including plasmids and transposons. Vancomycin-resistant enterococci pose major problems in treating human clinical infections, as this drug is used as last resort treatment for multiple antibiotic resistant enterococci (Ogier and Serror, 2008). Moreover, the transfer of vancomycin-resistance from *E. faecalis* to other pathogens such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has been reported in the last decade (Palmer et al., 2010). Virulence determinants also contribute to fitness and persistence of enterococci in nosocomial infections. Among the virulence factors that can be found in *E. faecalis*, some are sporadically detected in dairy isolates (Popović et al., 2018), like the aggregation substance (*asa1*), gelatinase (*gelE*), collagen adhesin (*ace*), enterococcal surface protein (*esp*) and cytolysin (*cylA*). For these reasons, *Enterococcus* species have not the GRAS status or recommendations for QPS list (EFSA Panel on Biological Hazards, Ricci et al., 2017), and the absence of transferable antibiotic resistance genes and/or potential virulence determinants should be investigated for each new potential probiotic strain intended to be proposed for food or pharmaceutical industry.

North African countries have an ancient tradition in food technology. Traditional dairy products and cheese remain very popular in Tunisia, consumed at breakfast, after lunch and at dinner. These traditional foods are still prepared at the household level and marketed through informal routes. The composition of these products is often not well characterized, varying with regions and local markets, sometimes using raw material of poor microbiological quality, or lacking hygiene conditions (Benkerroum, 2013). In order to improve the safety and quality of these foods, to promote the trading of such traditional foods internationally, and to be competitive in local markets, there is an urgent need for North African countries to develop and standardize new starters or probiotic strains in conformity with the Codex Alimentarius standards, WTO, FAO and EFSA legislations.

In this context, the aim of this work was to evaluate the probiotic potential and safety of *E. faecalis* OB14 and OB15, two strains isolated from traditional fermented Tunisian dairy products (Testouri cheese and Rigouta), in comparison to the known probiotic *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and Isolation of Lactic Acid Bacteria (LAB)

A total of five samples of Tunisian traditional fermented dairy products (Testouri cheese, Rigouta, yogurt, Leben, Rayeb) were collected from local markets in different cities. 10 g or 10 mL of each dairy sample were suspended aseptically in 90 mL of sodium citrate solution (pH 7.0) and homogenized by vortexing. Each suspension was then serially diluted, in NaCl 0.9%, plated on Man-Rogosa-Sharpe (MRS) medium and incubated for 48 h at 37°C under anaerobic conditions to isolate Lactic Acid Bacteria (LAB). Single isolated colonies were picked and purified by repeated streaking, then grown overnight in MRS broth at 37°C and stored at −20°C in 20% (w/v) glycerol.

Identification of OB14 and OB15

The isolates of LAB were presumptively identified by phenotypic analysis (colony morphology, Gram staining and catalase assay), and then by the simultaneous combination of the MALDI-TOF MS Biotyper system and species-specific PCR assay.

MALDI-TOF MS Biotyper

Bacteria were identified by analysis of the total proteome using an Autoflex III Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight mass spectrometer (MALDI-TOF MS; Bruker, Marcy-l'Etoile, France) coupled to the MALDI-Biotyper 3.1 system, as previously described (Hillion et al., 2013; Zommiti et al., 2018). Formic acid was used on the bacterial spots as a quick extraction procedure (Haigh et al., 2011), then the MALDI target plate was introduced in the mass spectrometer for measurement and data acquisition. For each sample, 600 spectra were pooled, and the generated spectra were compared with the MALDI-Biotyper 3.1 database. A score was calculated based on the matching between the reference spectrum and the unknown spectrum. A score of $\geq$1.7 allows genus identification, and a score of $\geq$2.0 is the set threshold for identification at the species level (Sogawa et al., 2011). Dendrograms were generated from the minimal spanning tree data set (Elbehiry et al., 2017). For this, the main spectra of the Maldi Biotyper taxonomy were compared with the spectra resulting in a matrix of cross-wise identification scores. This matrix was applied to estimate the distance level of the bacteria for each pair of main spectra.

Species-Specific PCR Assay

Genomic DNA was extracted according to Delley et al. (1990). *E. faecalis* OB14 and OB15 were identified using the *E. faecalis* species-specific primers EflF1 (5′-ACCAATGT TGGCACAAGAAA-3′) and EflR1 (5′-TTTCGTTCAAG CGGTCTTTT-3′) as described by Park et al. (2017) with slight modifications. The PCR reactions were performed with the Thermo Scientific PCR Master Mix, in a total volume of 50 μL, using approximately 1 μM of forward and reverse primers and 10 pg–1 μg of DNA template. Amplification conditions were as follows: a first denaturation step at 94°C for 5 min, 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 56°C for 1 min, extension at 72°C for 1 min, followed by a final elongation step at 72°C for 10 min. The PCR products were analyzed on 1% agarose gel electrophoresis, stained with SYBR Safe DNA gel stain and examined under UV light.

E. faecalis OB14 and OB15 isolates, both correctly identified by MALDI-TOF MS Biotyper and species-specific PCR, were selected for the further experiments. Unless otherwise stated, the bacteria were routinely precultivated and cultivated in MRS broth at 37°C.

Acid and Bile Salts Tolerance

For the acid tolerance test, the method described by Ramos et al. (2013) was utilized including some modifications. To simulate the acidic conditions of the gastrointestinal tract, MRS was adjusted to pH 3.0 with 1 N HCl (Azat et al., 2016). Bacterial cells from fresh overnight culture were centrifuged (10,000 × *g*, 10 min), washed twice with Phosphate Buffer Saline (PBS), and resuspended to approximately 10^8 bacteria/mL in the MRS broth pH 3.0. One mL of culture was taken immediately from each tube, diluted, and plated on MRS agar. Similarly, one mL was taken after 3 h of incubation at 37°C, reflecting the time spent in the human stomach. The colony forming units (CFU) were then counted, expressed as log 10 values of colony-forming units per milliliter (CFU/mL) and the bacterial survival rate (SR) was calculated.

The bile salts tolerance was tested as previously described by Anandharaj et al. (2015) with slight modifications. Freshly prepared overnight cultures were harvested by centrifugation and resuspended in MRS broth added with 0.3% bile salts (Oxgall, Sigma-Aldrich, France) followed by incubation at 37°C for 4 h, simulating the human intestine transit time. Aliquots were withdrawn at 0 and 4 h interval, diluted, and plated on MRS agar. Bile salts tolerance was assessed in terms of viable colony counts after aforesaid incubation at 37°C. The SR was calculated as described above for acid tolerance.

Hydrophobicity and Autoaggregation

Hydrophobicity was estimated as previously reported by Rosenberg et al. (1980). Overnight cultures were centrifuged and resuspended at 10^8 bacteria/mL. The cell suspensions (3 mL) were mixed with xylene (1 mL) for 2 min. After 1 h of incubation at room temperature, the aqueous phases were transferred to a spectrophotometry cuvette and the absorbance at 600 nm was measured. Hydrophobicity (%) was calculated as follows: $H\% = [(A_0 - A)/A_0] \times 100$, where A_0 and A are absorbance values found before and after solvent extraction.

Autoaggregation test was performed as described by Del Re et al. (2000) and Collado et al. (2008) including slight modifications. Overnight cultures were centrifuged (10,000 × *g*, 10 min), washed twice with PBS, and resuspended in this buffer to obtain a viable cell counts of approximately 10^8 CFU/mL. Bacterial suspensions (4 mL) were vortexed for 15 s and incubated at room temperature. At time 0 and 24 h after incubation without mixing, 1 mL of the upper suspension was taken to measure the absorbance (A) at 600 nm. The autoaggregation was then calculated as follows: autoaggregation (%) = $[1 - (A_{24h}/A_0) \times 100]$.

Biofilm Formation

Biofilm production on abiotic surfaces was studied in microtiter plates as performed by Bujnakova et al. (2014) and Gómez et al. (2016) with minor modifications. After 24 h incubation at 37°C, the adherent biofilms were gently washed, fixed, dried at room temperature, and stained with 0.1% crystal violet. Excess stain was rinsed off by placing the microtiter plates under running tap water. Then, the dye bound to adherent cells was removed with glacial acetic acid and the absorbance of the resulting solutions was measured at 595 nm. Biofilm formation was expressed using OD_C cut-off values as previously described (Extremina et al., 2011; Diaz et al., 2016), and the strains were then classified as belonging to one of the following

categories: ODc < OD ≤ 2 × ODc = weak biofilm producer, 2 × ODc < OD ≤ 4 × ODc = moderate biofilm producer, and OD > 4 × ODc = strong biofilm producer.

Gelatinase Assay

The gelatinase activity was investigated using Nutrient medium containing 3% (w/v) gelatin according to Ben Braïek et al. (2018). *E. faecalis* OG1RF was used as reference for quality control.

Caco-2/TC7 Culture

Human enterocyte-like Caco-2/TC7 cell line was routinely grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen, France), supplemented with 15% heat-inactivated fetal bovine serum and Penicillin/Streptomycin, at 37°C in a humidified incubator with 5% CO_2-95% air atmosphere. The medium was changed daily, and the cells were passaged and subcultured each week. For adhesion assay, cytotoxicity test and interleukine-10 (IL-10) quantification, the cells were seeded in 24-well tissue culture plates. For transepithelial electrical resistance (TER) measurement, the cells were grown on insert (3 μm pore size) for 21 days to ensure epithelial differentiation.

Adhesion

Overnight bacterial cultures were harvested by centrifugation (10,000 × *g*, 10 min), resuspended in cell culture medium without serum and antibiotic to achieve a concentration of 10^8 bacteria/mL, and then applied on confluent Caco-2/TC7 monolayers. After 4 h of incubation at 37°C, in 5% CO_2-95% air atmosphere, monolayers were washed with sterile pre-warmed PBS to remove non-adherent bacteria and lysed by incubation for 15 min with 0.1% Triton X-100. The lysates were then diluted and plated onto de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar to determine the number of adherent bacteria.

Hemolytic Activity and Cytotoxicity

Hemolytic activity was determined on Columbia agar containing 5% of sheep blood, by streaking the bacteria on the surface of the solid medium. The plates were then incubated at 37°C for 48 h under aerobiosis conditions and examined for β- (positive) or γ- (negative) hemolysis as previously indicated (Semedo et al., 2003).

The cytotoxicity of the *E. faecalis* strains was tested on Caco-2/TC7 cells following overnight incubation with the bacteria, using the Neutral Red (NR) uptake test and an enzymatic assay (Cytotox 96 Promega, France), as described by Messaoudi et al. (2012) and Biaggini et al. (2017), respectively.

Quantification of the IL-10 Anti-inflammatory Cytokine

The level of interleukine 10 (IL-10) in the supernatants of Caco-2/TC7 cells was measured using the Human IL-10 ELISA Kit (Thermo Scientific), after overnight incubation of the cells with approximately 10^8 bacteria/mL.

Transepithelial Electrical Resistance

The effect of the bacteria on the TER of Caco-2/TC7 monolayers grown on inserts was measured using the Millicell Electrical Resistance system (Millipore, Bedford, MA, United States). The day before experiment, the inserts were washed with PBS to remove traces of antibiotics and the cell media was changed to the original media without antibiotics and serum. TER was measured before the addition of the bacterial suspension at 10^8 bacteria/mL and during 16 h. TER values were expressed as percentages of the initial level measured in each insert.

Antibiotic Susceptibility Testing

The antibiotic susceptibility of the *E. faecalis* strains was performed using the broth microdilutions method. The antibiotics selected were ampicillin, vancomycin, gentamicin and erythromycin. Overnight cultures of bacteria were inoculated at 10^5 CFU/mL in Mueller-Hinton broth supplemented with various concentrations of the antibiotics (0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, and 516 μg/mL). The MIC for each antibiotic was confirmed as the lowest concentration at which no growth was observed following a 24 h incubation period at 37°C. The susceptibility/resistance were determined according to the microbial cut-off values recommended by the European Food Safety Authority [EFSA], 2012).

Virulence Factors

Total DNA of *E. faecalis* OB14 and OB15, extracted previously for the Species-specific PCR assay, were used for PCR amplification of the following virulence determinants: aggregation substance (*asa1*), gelatinase (*gelE*), collagen adhesin (*ace*), enterococcal surface protein (*esp*) and cytolysin (*cylA*). PCR experiments were performed using the primer sequences and protocols described in Mannu et al. (2003), Reviriego et al. (2005), and Anderson et al. (2016).

Enterococcus faecalis V583 and *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431 were used as positive and/or negative control. The PCR products were analyzed on 1% agarose gel electrophoresis, stained with SYBR Safe DNA gel stain and observed under UV light.

Virulence in the *Galleria mellonella* Model

The *E. faecalis* strains used for infection of *G. mellonella* were grown for 24 h in M17 supplemented with 0.5% glucose (GM17). After centrifugation, bacterial cells were washed once in 0.9% NaCl and resuspended to a final $OD_{600\ nm}$ of 1 (5.10^7 CFU/mL). The size of the inoculum was confirmed by numeration on solid GM17. Fifteen larvae were infected with 10 μL of a cell suspension through into the hemocoel using a microinjector (KDS100 Legacy, Fisher Scientific) with a sterilized microsyringe and incubated at 37°C. Larval surviving was monitored at 16 h, and then every hour until 24 h post-infection. *E. faecalis* V19 and *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431 were also tested under the same conditions as a virulent and non-virulent control, respectively.

Sequencing and Analysis of Whole Genome

Genomic DNA quality and quantity of *E. faecalis* OB14 and OB15 were examined on a 1% agarose gel electrophoresis, also

using a NanoDrop™ spectrophotometer and a Qubit®™ 4.0 fluorometer (Qubit® dsDNA HS assay). DNA libraries for whole genome sequencing (WGS) were constructed using Nextera™ XT DNA Library Prep Kit according to the manufacturer's instructions (Illumina, San Diego, CA, United States). The sequencing was performed on the Illumina MiSeq platform (LMSM Evreux, Rouen Normandy University) using Reagent Kit v3 (600-cycle, Illumina, United States) to generate 2 × 250 bp paired-end reads.

Paired-end reads were trimmed using Trimmomatic v.0.36 (Bolger et al., 2014). Sequence data quality was checked using FastQC v.0.11.6.[1] Assembly of paired-end reads was done *de novo* using Spades software package v.3.12.0 (Bankevich et al., 2012) using its in-build read error correction functionality of BayesHammer (Nikolenko et al., 2013) by setting the "carefull" option, and *k*-mer combination was set to 21, 33, 55, 77, 99 and 127. The obtained drafts were checked for consistency, such as the number of contigs, N50, GC% and total size of assembly using Quast v.5.0.0 (Mikheenko et al., 2018).

In addition to MALDI-TOF and specific PCR assays, confirmation of cluster analysis was achieved using WGS data with two methods: (i) average nucleotide identity (ANI) was calculated using PYANI v0.2.7 (Pritchard et al., 2016; Pritchard, 2017), and (ii) genome-to-genome distance calculator (GGDC), which is an *in silico* DNA-DNA hybridization method (*is*DDH) using a webserver at ggdc.dsmz.de/ggdc.php (Meier-Kolthoff et al., 2013). The *is*DDH model "formula 2" was used as recommended for draft genomes.

MLST (Multilocus sequence typing) profile of each isolate was determined from the draft genome sequences using the software package MLST_check v. 2.1.1706216-1 (Page et al., 2016)[2] based on the *E. faecalis* PubMLST database[3].

ABRicate v.0.8.7 (Seemann, 2018), a mass screening software package of contigs, for resistome and virulome coding-genes detection, was used to screen against the NCBI Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database (NCBI BARRGD, PRJNA313047), and Virulence Factors of Pathogenic Bacteria Database (VFDB; Chen et al., 2016), respectively.

Statistical Analysis

Results are expressed as means ± standard error (SE) of three experiments done in triplicate. Analysis of statistical significance was performed with Student's *t*-test and GraphPad Prism7.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of the LAB Isolates OB14 and OB15

Lactic acid bacteria strains were isolated from traditional fermented Tunisian dairy products (Testouri cheese, Rigouta, yogurt, Leben, Rayeb). Two *Enterococcus* strains (Gram positive, catalase negative, coccus morphology), OB14 and OB15, respectively found in Testouri cheese and Rigouta from two different Tunisian regions, were selected for MALDI biotyper and species-specific PCR assays, for confirmation of the genus *Enterococcus* and determination of the species. The analysis by MALDI biotyper classified OB14 and OB15 isolates as *E. faecalis* strains with score value >2.0, which allows to identify at the species level with no doubt (Sogawa et al., 2011).

PCR amplification with *E. faecalis* specific primers (Park et al., 2017) confirmed results found by MALDI biotyper. As expected, a PCR product of 1,209 bp was obtained for the two isolates and for the probiotic *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431, corresponding to the specific amplification of the 6-aminohexanoate-cyclic-dimer hydrolase (EC 3.5.2.12) target gene of *E. faecalis*.

Hierarchical Cluster Analysis

Besides bacterial identification, MALDI-TOF MS allows hierarchical cluster analysis, using an algorithm to determine the relatedness between the MS spectrum of each bacteria. MS spectra of *E. faecalis* OB14 and OB15 were compared to the MS spectrum of the reference probiotic strain *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431, and to MS spectra of the *E. faecalis* strains available in the Biotyper library. For this, spectra were merged, and the merging patterns were then represented as dendrograms or tree structures (**Figures 1A,B**). Since spectra were merged by relatedness, the distance of branches on the dendrograms relates directly to the similarity of spectra and, hence, the similarity of the bacteria studied. Unexpectedly, *E. faecalis* OB15 was found to be closely related to Symbioflor 1 DSM 16431 than to OB14, the other Tunisian dairy isolate (**Figure 1A**), or to the reference strains of the Biotyper library (**Figure 1B**).

Whole genome analysis using the ANI and the Genome-to-Genome Hybridization similarity methods also showed that *E. faecalis* OB15 is closer to Symbioflor 1 DSM 16431 than to OB14 in terms of genomic distance (**Figure 2A**). This agrees with hierarchical cluster analysis from MALDI-TOF MS.

To complete these data, the overall genomic differences between *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431 and the OB15 strain have been investigated by aligning the two genomes using MAUVE v.20150226 (**Figure 2B**; Darling et al., 2004). This alignment suggests a high level of conservation along the chromosome. Indeed, OB15 and Symbioflor 1 DSM 16431 genomes were found to be organized in a very similar way, except one inversion of physically close syntenic block highlighted by arrows.

MLST analysis allowed to identify sequence types (ST) of *E. faecalis* OB15 and *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431, by comparing their sequences with alleles from the *E. faecalis* MLST database. This showed that the MLST profile of OB15 and Symbioflor 1 DSM 16431 are not similar (OB15 belongs to clone ST25 and Symbioflor 1 DSM 16431 is clone ST248).

Once identified, *E. faecalis* OB14 and OB15 were then evaluated for their probiotic potential using physiological

[1] http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc

[2] https://github.com/sanger-pathogens/mlst_check

[3] https://pubmlst.org/efaecalis/ (accessed February 19, 2019).

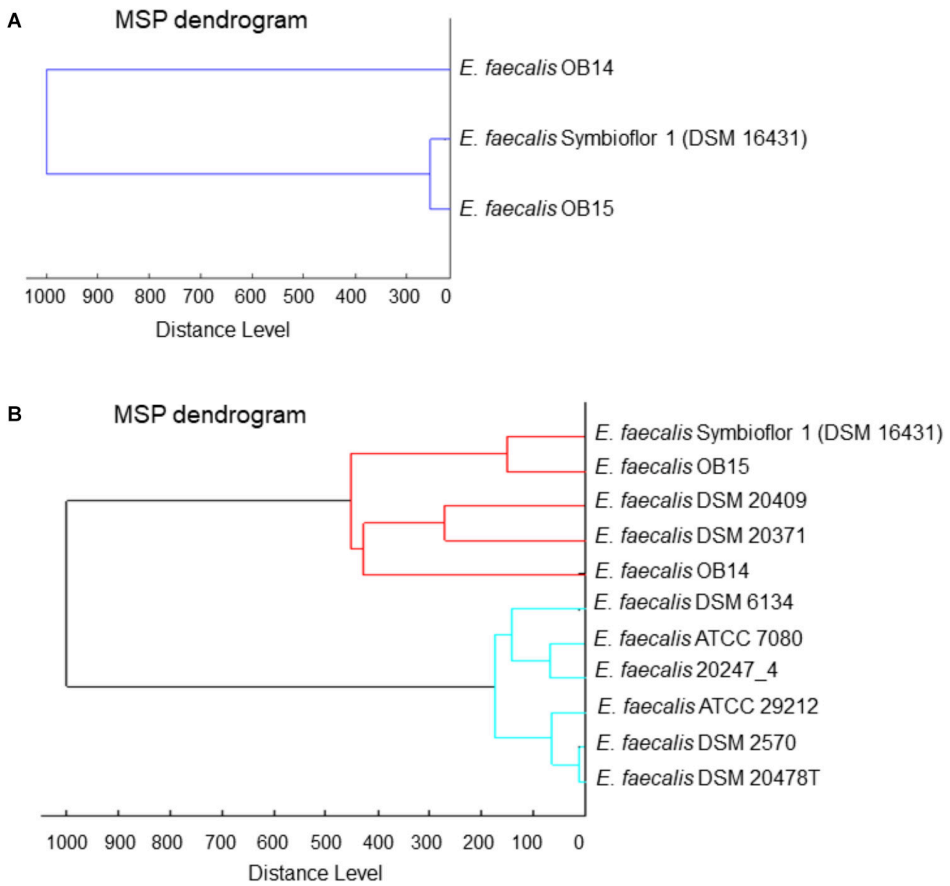


FIGURE 1 | Dendrograms (representations of hierarchical cluster analysis) of the Tunisian dairy isolates *Enterococcus faecalis* OB14 and *E. faecalis* OB15, **(A)** compared to *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431 and **(B)** to the reference strains of the Biotyper library.

tests and *in vitro* analysis (gastric and intestinal transit tolerance, hydrophobicity and autoaggregation, biofilm/adhesion on abiotic surface, adhesion to intestinal cells, production of the anti-inflammatory cytokine IL-10, modulation of the epithelial barrier).

Probiotic Potential of OB14 and OB15

Gastric and Intestinal Transit Tolerance

An effective property as prerequisite for probiotics is their ability to resist to the harsh condition in the stomach and the small intestine (Ouwehand et al., 2002). Therefore, *E. faecalis* OB14 and OB15 were tested for their ability to survive in acidic condition and in the presence of 0.3% bile salts, compared to the *E. faecalis* Symbioflor 1 probiotic strain. **Table 1** showed that after 3 h of incubation at pH 3.0, *E. faecalis* OB14 and OB15 retained their viability with 84.7 and 97.3% survival rate, respectively. *E. faecalis* OB15 showed a highly similar viability to Symbioflor 1 (97.4%), whereas the survival of *E. faecalis* OB14 was slightly affected (−15%).

A genome analysis of *E. faecalis* Symbioflor 1, performed by Domann et al. (2007) revealed the presence of genes that mediate resistance against oxidative stress, and may facilitate the bacteria to survive exposure to gastric acid following consumption, and to survive and proliferate in the intestine. Haghshenas et al. (2016) have also reported that *Enterococcus* strains showed better low pH tolerance than many LAB strains belonging to *Lactobacillus*, *Lactococcus* or *Leuconostoc* genus. This high tolerance capability can be associated to the bilayer membrane structure, which allows easy tolerance of inverse conditions.

In the current study, the tolerance of *E. faecalis* OB14 and OB15 to 0.3% bile salts was also tested (**Table 1**). This concentration has been recommended as suitable for screening probiotic, as it simulates the conditions within the gastrointestinal tract (Goldin and Gorbach, 1992). The two isolates displayed high tolerance to bile salts, after 4 h of incubation, with a survival >80%, similarly to *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431, the probiotic reference added in the experiment (**Table 1**). These findings are in accordance with previous studies that showed that *Enterococcus* species had the highest tolerance capability in the bile salts conditions among LAB group (Klaenhammer and Kullen, 1999). For example, it has been found that *E. faecalis* 13C can strongly tolerate 0.3% oxgall with a survival rate of 98% after 3 h of incubation (Haghshenas et al., 2016), and *E. faecalis* CP58 was capable to retain viability for 6 h with a survival rate of 92.6% (Nueno-Palop and Narbad,

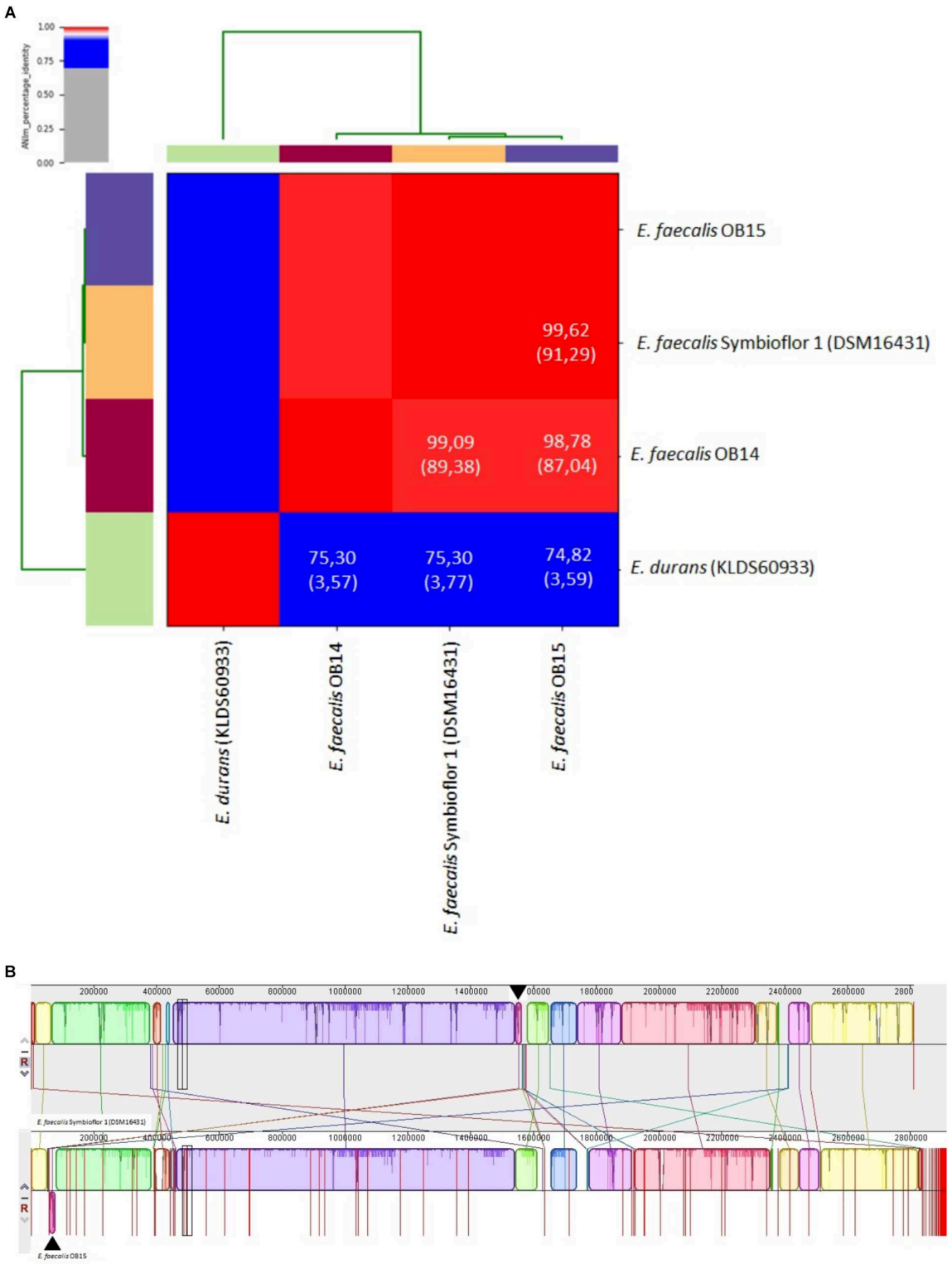


FIGURE 2 | (A) Heat-map of Average Nucleotide Identity (ANI) between *Enterococcus faecalis* OB14, *E. faecalis* OB15 and *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431. ANI values (%) and coverage (between brackets) are also indicated. **(B)** Pairwise alignment between the reference strain Symbioflor 1 and the related strain OB15 using the MAUVE software. Colored blocks outline genome sequences that align to the other genome and are presumably homologous and internally free of genomic rearrangement (Locally Colinear Blocks or LCBs). White regions correspond to sequences that are not aligned and probably contain sequence elements specific to a genome. Blocks below the center line indicate regions that aligned in the reverse complement (inverse) orientation. The height of the profile within each LCB demonstrates the average degree of sequence conservation within an aligned region.

TABLE 1 | Acid and bile salts tolerance of *Enterococcus faecalis* OB14, *E. faecalis* OB15 and *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431.

Strains	Acid tolerance			Bile salts tolerance		
	Viable counts (log CFU/mL)		Survival rate (%)	Viable counts (log CFU/mL)		Survival rate (%)
	T0	T3		T0	T4	
E. faecalis OB14	7.8 ± 0.2	6.6 ± 0.1	84.7	8.2 ± 0.3	6.9 ± 0.2	85.2
E. faecalis OB15	7.4 ± 0.4	7.2 ± 0.2	97.3	7.8 ± 0.1	6.7 ± 0.3	86.1
E. faecalis Symbioflor 1 (DSM 16431)	7.8 ± 0.3	7.6 ± 0.2	97.4	7.9 ± 0.3	6.8 ± 0.4	87.0

Values are mean of triplicate ± standard error.

2011). Some strains of *Enterococci*, isolated from canine feed, were even found to be able to grow in the presence of 5% Oxgall (Lauková et al., 2008).

Hydrophobicity and Autoaggregation

Hydrophobicity is a physicochemical feature related to the capacity of bacteria to autoaggregate and adhere to various types of surfaces including eukaryotic cells. Thus, the affinity of *E. faecalis* OB14 and OB15, and Symbioflor 1 DSM 16431 toward the hydrophobic solvent xylen was examined. The results of this experiment showed 68.8, 78.6, and 38.6% hydrophobicity, respectively (**Figure 3A**). Concerning autoaggregation (**Figure 3B**), the probiotic strain *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431, used as reference, showed the higher percentage reaching 63.9%, whereas the scores for *E. faecalis* OB14 and OB15 strains were 54.3 and 48.9%, respectively. These percentages are consistent to the autoaggregation of *E. faecalis* 14 (49%), that has been isolated from the meconium of human donors and considered as high autoaggregative strain (Al Atya et al., 2015). Hydrophobicity and autoaggregation are beneficial attributes for probiotics, necessary for adhesion to intestinal cells, and to form a barrier that prevents the colonization by food-borne pathogens (Pelletier et al., 1997; Dunne et al., 2001; Collado et al., 2008).

Biofilm/Adhesion on Abiotic Surface

Biofilm-forming abilities of *E. faecalis* OB14 and OB15, and *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431, were evaluated on abiotic surfaces. The three strains were found to be weak to moderate biofilm producers (data not shown). Adhesion to abiotic surfaces is not routinely investigated in probiotic strains, even if a positive correlation often exists between biofilm formation on abiotic surfaces and adhesiveness to biotic surfaces (Bujnakova et al., 2014). Thus, to better estimate adhesion of the isolates to the gut, this parameter was then investigated on Caco-2/TC7 intestinal cells.

Adhesion to Intestinal Cells

Bacterial adhesion to epithelial cells is considered as one of the most reliable features for selection criteria of probiotic strains (Garcia-Gonzalez et al., 2018). Caco-2 cell line has been frequently used as an *in vitro* model to screen for adhesive strains (Elo et al., 1991; Chauvière et al., 1992; Bernet et al., 1994). In this study, the adhesion of *E. faecalis* OB14 and OB15 to Caco-2/TC7 cells was investigated and compared to the adhesion of *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431. The results found showed adhesive potential in the range of 3–12% for the three strains. This agrees with other reports that have investigated the capacity of attachment of *E. faecalis* to cell lines. For example, a rate of approximately 2% adhesion was recently found for *E. faecalis* B3A-B3B, a bacteriocinogenic strain that has been isolated from a healthy Iraqi infant (Al Seraih et al., 2018). Indeed, after treatment of the Caco-2 cells with 10^7 bacteria for 2 h, the authors recovered 1.8 10^5 CFU/mL of adherent bacteria. Similarly, Nueno-Palop and Narbad (2011) have previously found an adhesion rate of 2.6%

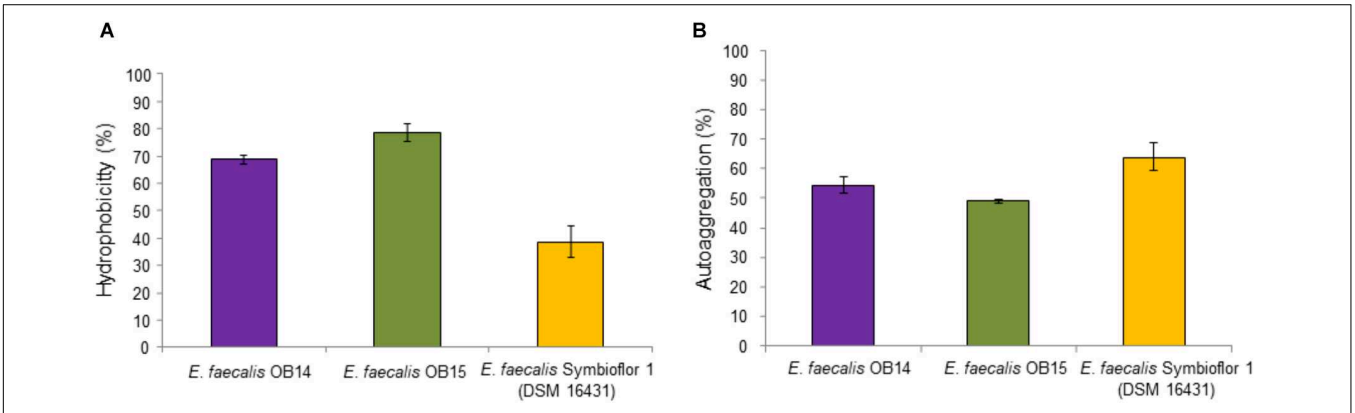


FIGURE 3 | Hydrophobicity **(A)** and autoaggregation **(B)** of *Enterococcus faecalis* OB14, *E. faecalis* OB15 and *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431.

for *E. faecalis* CP58 isolated from human gut. These values have been considered has high capability to adhere to Caco-2 cells for *Enterococcus* strains with dairy origin (Cebrián et al., 2012; Pimentel et al., 2012).

It has been reported that the mechanism of adhesion to Caco-2/TC7 cells involves the combinations of carbohydrate and protein factors on the bacterial cell surface (Kimoto-Nira et al., 2007). In *Enterococcus*, the aggregation substance, is known to play a role in adherence to eukaryotic cells (Mundy et al., 2000). Aggregation factors may be advantageous for probiotic strains, since it can help the bacterium, to colonize the intestine after consumption, to proliferate and hence to display its probiotic traits (Veljović et al., 2017).

Production of IL-10

The ability of LAB to modulate cytokines production is considered as another criterion for the selection of beneficial microbes (Amit-Romach et al., 2010). IL-10 has interesting impact on immunoregulation, since it inhibits type 1/proinflammatory cytokine formation (Asadullah et al., 1998). Therefore, we quantified the IL-10 secretion by Caco-2/TC7 cells to investigate the ability of *E. faecalis* OB14 and OB15 to modulate inflammatory reaction in human intestinal cell lines, compared to the effect of *E. faecalis* Symbioflor 1. The results obtained by the ELISA assay (**Figure 4**), showed that *E. faecalis* OB14 induced a 28% increase of IL-10 secretion by Caco-2/TC7 cells (production of 17.8 pg/mL compared to 13.9 pg/mL for the basal cytokine value); *E. faecalis* Symbioflor 1 induced a 17% increase (production of 16.3 pg/mL), whereas *E. faecalis* OB15 had no effect. These differences among bacteria are not surprising since the immunomodulatory effects are often strain-specific (Helwig et al., 2006; Snel et al., 2011). Indeed, Al Seraih et al. (2018) have studied the anti-inflammatory effect of the B3A-B3B *E. faecalis* strain, isolated from an infant faces, and found that this bacterium had no effect on IL-10 production by Caco-2 cells. Conversely, Are et al. (2008) demonstrated that *E. faecalis* EC16, isolated from a healthy newborn baby, could induce the anti-inflammatory cytokine IL-10 in the intestine through PPAR-gamma, and eliminate the inflammatory responses. Similarly, Wang et al. (2014) showed that *E. faecalis* from healthy infants modulates inflammation through MAPK signaling pathways.

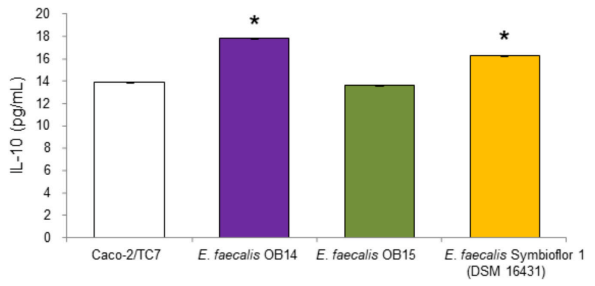


FIGURE 4 | Quantification of IL-10 in the supernatants of Caco-2/TC7 cells after treatment with *Enterococcus faecalis* OB14, *E. faecalis* OB15 and *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431. *$P < 0.05$ compared to Caco-2/TC7.

Modulation of the Epithelial Barrier

Changes in the TER of polarized Caco-2/TC7 cells were used as an indicator of the effect of *E. faecalis* OB14 and OB15 on the intestinal epithelial barrier function (**Figure 5**). The results showed that the bacteria maintained the TER almost constant for the first 6 h compared to the initial value in the insert. After 16 h, *E. faecalis* OB14 and OB15, increased the TER, similarly to *E. faecalis* Symbioflor 1. Lodemann et al. (2015) also showed that a strain of *Enterococcus* (*E. faecium* NCIMB 10415) can enhance the TER when administered at a concentration of 10^6/1.12 cm^2.

After the investigation of these beneficial attributes for *E. faecalis* OB14 and OB15 as probiotic candidates, we examined the safety of the bacteria using various tests (antibiotic susceptibility, hemolysis and cytotoxicity, virulence).

Safety Evaluation of OB14 and OB15

Antibiotic Susceptibility

One of the required properties by which specific strains can be considered as a potential probiotic bacterium is that they must not harbor acquired and transferable antibiotic resistances (Courvalin, 2006; Zheng et al., 2017). **Table 2** shows the MICs of *E. faecalis* OB14 and OB15 to the four selected antibiotics from two different groups: cell wall inhibitors (ampicillin and vancomycin) and protein synthesis inhibitors (gentamicin and erythromycin), compared to the *E. faecalis* Symbioflor 1 reference strain. Strains were considered resistant when they showed MIC values higher than the MIC breakpoints established by the EFSA (2012). The three strains exhibited the same pattern of sensitivity/resistance to the antibiotic tested. They were sensitive to the clinically important antibiotics ampicillin (MIC = 1 μg/mL) and vancomycin (MIC = 2 μg/mL), and resistant to gentamicin (MIC = 128 μg/mL and erythromycin (MIC > 256 μg/mL).

Genomic analysis was used to complete these data and showed absence of genes conferring resistance to vancomycin, in both *E. faecalis* OB14 and OB15. Furthermore, sequencing data showed that *E. faecalis* OB14 harbored tetracycline resistance determinants unlike to *E. faecalis* OB15 and *E. faecalis* Symbioflor 1.

Various opinions exist as to whether it might be desirable that some probiotic strains show resistance to specific antibiotics. On the one hand, some lactic acid bacteria can serve as host for antibiotic resistance genes and transfer these genes to pathogens. However, many of the resistance observed are intrinsic or natural resistance and non-transmissible (Salminen et al., 1998; Voravuthikunchai et al., 2006). It gives advantages in the clinical application, as this allows the probiotic to be taken at the same time as the antibiotic treatment. Resistance of enterococci to gentamicin has been described as intrinsic and partially attributed to a poor uptake of the antibiotic (Kristich et al., 2014). Resistance to erythromycin seems to be intrinsic as well, non-transmissible, and is widely spread among enterococci commonly found in foods (Barbosa et al., 2009). Recently, a high rate of erythromycin

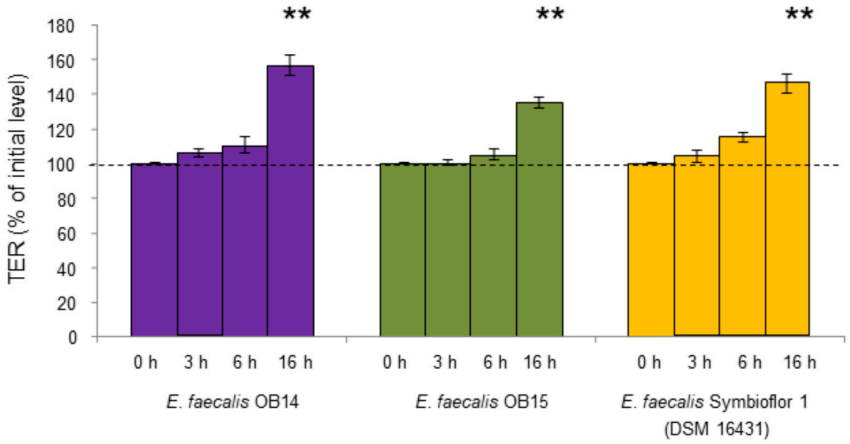


FIGURE 5 | TER of Caco-2/TC7 cells exposed to *Enterococcus faecalis* OB14, *E. faecalis* OB15, and *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431. $^{**}P < 0.01$ compared to initial value.

TABLE 2 | Antibiotic susceptibility of *Enterococcus faecalis* OB14, *E. faecalis* OB15 and *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431.

	Minimum inhibitory concentrations (MICs in μg/mL)			
	Ampicillin	**Vancomycin**	**Gentamicin**	**Erythromycin**
E. faecalis OB14	1 (S)	2 (S)	128 (R)	>256 (R)
E. faecalis OB15	1 (S)	2 (S)	128 (R)	>256 (R)
E. faecalis Symbioflor 1 DSM 16431	1 (S)	2 (S)	128 (R)	>256 (R)

(S) and (R): Susceptible and Resistant strain, according to the breakpoints established by EFSA. The EFSA Enterococcal breakpoints (mg/L): 2 mg/L (ampicillin), 4 mg/L (vancomycin), 32 mg/L (gentamicin) and 4 mg/L (erythromycin).

resistance has also been detected among Enterococci isolated from Artisanal Tunisian Meat "Dried Ossban" (Zommiti et al., 2018). Macrolides are frequently used in animal husbandry; this could contribute to the emergence of many resistant strains (Diarra et al., 2010). The most frequent type of macrolide resistance is the production of a methylase enzyme, encoded by erm genes (MLSB phenotype) which specifically methylates an adenine residue in the 23S rRNA of the 50S ribosomal subunit. This reduces the binding affinity of macrolides for the ribosome and hence renders macrolides ineffective (Kristich et al., 2014). Another mechanism of resistance is due to the presence of an efflux pump system mediated by the membrane-bound efflux protein, encoded by mef (A/E) and msr genes. Finally, in a study conducted by Anderson et al. (2016), tetracycline-resistance was also found to be frequently present in food (13/14 isolates tested). Besides the presence of some antibiotic's resistance in *Enterococcus* strains in foods, a recent work concludes that *E. faecalis* isolated from raw milk cheeses does not represent a substantial reservoir of antimicrobial resistance and virulence factors if compared with clinical strains (Silvetti et al., 2019).

Hemolysis and Cytotoxicity

To develop or select new beneficial microbes, their absence of hemolysis capacity and/or cytotoxicity should be assessed at first (Salminen et al., 1998). Indeed, although some strains of *Enterococcus* have been previously used for their technological properties, or as probiotic for humans and animals, a case-by-case-evaluation is needed (Araújo and Ferreira, 2013; Hanchi et al., 2018).

As mentioned above, hemolytic activity has been determined on Columbia agar containing 5% of sheep blood, by streaking the bacteria on the surface of the solid medium. The results obtained after 48 h incubation at 37°C under aerobic conditions are presented on **Figure 6A**. Observation of the Columbia agar plates showed no hemolysis zones of red blood cells (γ-hemolysis) for *E. faecalis* OB14 and OB15 similarly as the *E. faecalis* Symbioflor 1 probiotic strain. However, erythrocytes from different species were previously found to show various levels of susceptibility to hemolysin-mediated lysis. Sheep red blood cells were less susceptible than rabbit, human and horse red blood cells (Semedo et al., 2003). Thus, to complete this analysis, as no hemolysis has been observed in the present work, the cytotoxicity of *E. faecalis* OB14 and OB15 was also studied on the Caco-2/TC7 intestinal cell line. The NR uptake assay, used to quantify the viable cells, showed high rates of eukaryotic cell survival ranging from 79.8 to 85.9%, after contact with the three bacteria (**Figure 6B**). In accordance with these results, the cytotoxicity test using Cytotox 96 kit displayed mortality below 10% after incubation with the bacteria, similarly to natural death of cells (data not shown).

The absence of cytotoxicity of *E. faecalis* OB14 or OB15, compared to *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431, was reinforced by microscopic observations which did not show any damage of the cell monolayers (**Figure 6B**). These results agree with the

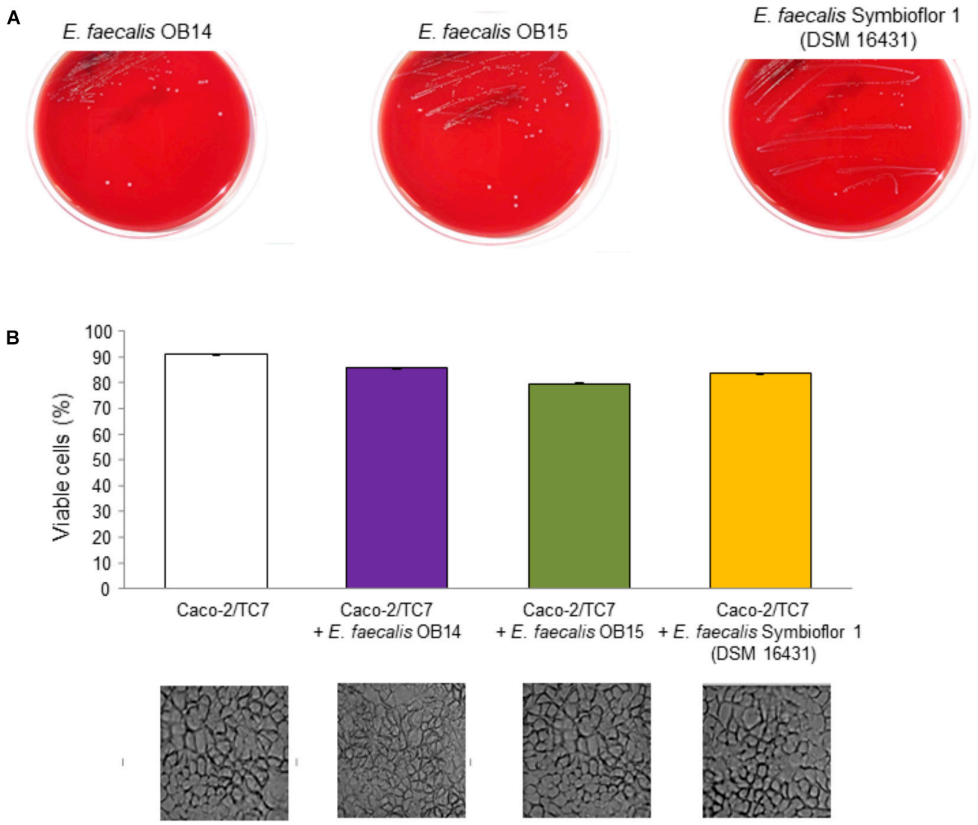


FIGURE 6 | Hemolysis assay **(A)** of *Enterococcus faecalis* OB14, *E. faecalis* OB15 and *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431 on Columbia agar containing 5% of sheep blood. Viability of Caco-2/TC7 cells **(B)** measured using the Neutral Red uptake assay and observed by microscopy after treatment with 10^8 bacteria/mL of *E. faecalis* OB14, *E. faecalis* OB15 and *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431, compared to untreated Caco-2/TC7 cells.

TABLE 3 | Potential virulence factors of *Enterococcus faecalis* OB14 and *E. faecalis* OB15 detected by PCR and genomic analysis.

Gene	Product	*E. faecalis* OB14		*E. faecalis* OB15	
		PCR	Genomic analysis	PCR	Genomic analysis
asa1	Aggregation substance	+	+	+	+
gelE	Gelatinase	+	+	+	+
Ace	Collagen adhesion protein	–	–	–	–
Esp	Enterococcal surface protein	–	–	–	–
cylA	Cytolysin activator	+	+	–	–
cylB	Cytolysin transport	nd	+	nd	–
cylI	Cytolysin immunity	nd	+	nd	–
cylIL	Cytolysin precursor	nd	+	nd	–
cylIM	Cytolysin modification	nd	+	nd	–
cylS	Cytolysin precursor	nd	+	nd	–

nd, not determined.

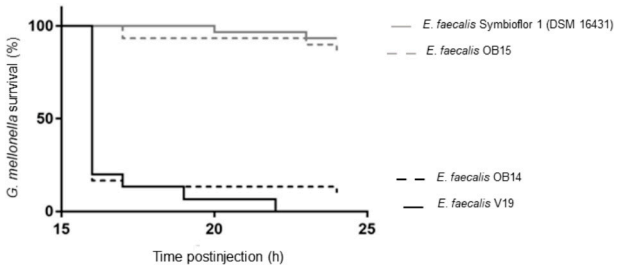


FIGURE 7 | *Galleria mellonella* survival following injection with *Enterococcus faecalis* OB14, *E. faecalis* OB15, *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431 or *E. faecalis* V19.

known safety of *E. faecalis* Symbioflor 1 (Christoffersen et al., 2012; Fritzenwanker et al., 2013). This bacterium has been shown to not be toxic in an *in vivo Caenorhabditis elegans* model and has been used as probiotic for humans for many years without triggering infection (Domann et al., 2007; Neuhaus et al., 2017).

Analysis of Virulence Genes

The investigation of virulence determinants is an absolute prerequisite to characterize *E. faecalis* strains and classify them as probiotics or conversely potential pathogens, and to avoid the risk of dissemination of virulence factors to other bacteria by genetic transfer. Thus, presence/absence of the aggregation substance (*asa1*), gelatinase (*gelE*), collagen adhesin (*ace*), enterococcal surface protein (*esp*) and cytolysin (*cylA*) genes were checked by PCR assays and whole genome sequencing (WGS; **Table 3**).

The *ace* and *esp* genes were not found in *E. faecalis* OB14 and OB15 whereas *asa1* and *gelE* gene were detected by both methods. These results are not surprising as Domann et al. (2007) showed that the genotype of the *E. faecalis* Symbioflor 1 probiotic was also esp^{-} and *agg* $(asa1)^{+}$, but conversely for the two other genes, these authors found that the strain was *ace*+ and $gelE^{-}$. However, despite the presence of *gelE* gene in *E. faecalis* OB14 and OB15, these bacteria failed to degrade gelatin on Nutrient gelatin medium (data not shown). This gene may be silent or expressed at a low level in our experimental conditions. Besides, all the genes belonging to the cytolysin operon (*cylA, cylB, cylI, cylL, cylM*, and *cylS*) were found in *E. faecalis* OB14, but not in OB15. Due to the detection of some virulence genes in *E. faecalis* OB14 and OB15, a test of safety/virulence was then performed on the *Galleria mellonella in vivo* model.

Virulence Test on *Galleria mellonella* Model

Mammalian models of infection are costly and may raise ethical issues. As a reliable alternative, larvae of *Galleria mellonella* have been shown to be a powerful infection model to investigate virulence of various pathogens including *E. faecalis* (Ramarao et al., 2012). Thus, the virulence of *E. faecalis* OB14 and OB15 was estimated using this infection model, compared to *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431 (probiotic strain) and *E. faecalis* V19 (pathogenic strain). Larval surviving was monitored at 16 h, and then every hour until 24 h post-injection (**Figure 7**). The results show that *G. mellonella* larvae were able to survive inoculation of *E. faecalis* OB15 with the same survival profile that after injection with *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431, so this strain isolated from Rigouta can be considered as non-virulent and might be interesting for further development as potential probiotic. On the contrary, despite its food origin, *E. faecalis* OB14, isolated from Testouri cheese, led to a fast and drastic mortality of the larvae by 16 h post-injection, which was quite as toxic as the *E. faecalis* V19 lethal positive control of pathogenic strain. These results are in concordance with the presence of the cytolysin genes found in the genome of *E. faecalis* OB14, as cytolysin has been previously linked to virulence enhancement in animal models infected by *E. faecalis* and acute patient mortality in the clinic (Tang et al., 2018). By contrast, cytolysin genes were absent in *E. faecalis* OB15 and the bacterium was not toxic for the larvae. Taking together, all these results showed the necessity to follow the recommendations of guidance for selection of *Enterococcus* strains as probiotic, using intensive case by case evaluation for each strain, physiological analysis, whole genome sequencing and virulence models, even if the strains are isolated from a food ecological niche. Indeed, the risk of contamination with a pathogen strain during traditional process, due to a lack of hygiene or a poor quality of the raw material that has been used cannot be ruled out.

CONCLUSION

In vitro testing is a rational starting point for evaluating the safety of bacteria, to select potential probiotic or to establish their possible mechanisms of action, since *in vivo* methods are costly and need complex agreement by ethical committees. In the current study, it has been found that *E. faecalis* OB14 and OB15 can adhere to intestinal cells, tolerate gastric and intestinal conditions (acidity, bile), and demonstrate the capacity to reinforce the epithelial barrier, similarly to the known probiotic reference strain, *E. faecalis* Symbioflor 1 DSM 16431. However, despite its food origin, *E. faecalis* OB14 was found to harbor resistance to tetracycline and some important virulence traits as the presence of cytolysin genes. This has been confirmed by the *in vivo* test on *Galleria Mellonella* which led to a high percentage of larvae mortality, so this bacterium can not be selected for probiotic candidate. On the contrary, *E. faecalis* OB15, isolated from Rigouta, seems to be an interesting strain for further studies and probiotic development for traditional fermented food and feed industry.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MM, MF, FA, and NC designed the study. OB and NC carried out most of the experiments, analyzed the data, and drafted the manuscript. LF participated in the sampling and isolation of bacteria. KZ and ED provided the probiotic reference strain. AZ, MC, and OM contributed to the PCR assays. MB helped with the identification by MALDI-TOF MS. AB and OM conducted whole genome sequencing experiments and bioinformatic analysis. IR and CM performed the virulence test on the *Galleria mellonella* model. FA and NC co-supervised the entire project. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was supported by Evreux Porte de Normandie, Region Normandie and European Union (FEDER), and by Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

REFERENCES

Adnan, M., Patel, M., and Hadi, S. (2017). Functional and health promoting inherent attributes of *Enterococcus hirae* F2 as a novel probiotic isolated from the digestive tract of the fresh water fish *Catla catla*. *Peer J.* 5:e3085. doi: 10.7717/peerj.3085

Al Atya, A. K., Drider-Hadiouche, K., Ravallec, R., Silvain, A., Vachee, A., and Drider, D. (2015). Probiotic potential of *Enterococcus faecalis* strains isolated from meconium. *Front. Microbiol.* 6:227. doi: 10.3389/fmicb.2015.00227

Al Seraih, A., Belguesmia, Y., Cudennec, B., Baah, J., and Drider, D. (2018). *In silico* and experimental data claiming safety aspects and beneficial attributes of the bacteriocinogenic strain *Enterococcus faecalis* B3A-B3B. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 10, 456–465. doi: 10.1007/s12602-017-9357-8

Amit-Romach, E., Uni, Z., and Reifen, R. (2010). Multistep mechanism of probiotic bacterium, the effect on innate immune system. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 277–284. doi: 10.1002/mnfr.200800591

Anandharaj, M., Sivasankari, B., Santhanakaruppu, R., Manimaran, M., Rani, R. P., and Sivakumar, S. (2015). Determining the probiotic potential of cholesterol-reducing *Lactobacillus* and *Weissella* strains isolated from gherkins (fermented cucumber) and south Indian fermented koozh. *Res. Microbiol.* 166, 428–439. doi: 10.1016/j.resmic.2015.03.002

Anderson, A. C., Jonas, D., Huber, I., Karygianni, L., Wölber, J., Hellwig, E., et al. (2016). *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Front. Microbiol.* 6:1534. doi: 10.3389/fmicb.2015.01534

Araújo, T. F., and Ferreira, C. L. L. F. (2013). The genus *Enterococcus* as probiotics: safety concerns. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 56, 457–466. doi: 10.1590/S1516-89132013000300014

Are, A., Aronsson, L., Wang, S., Greicius, G., Lee, Y. K., Gustafsson, J. A., et al. (2008). *Enterococcus faecalis* from newborn babies regulate endogenous PPAR-activity and IL-10 levels in colonic epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1943–1948. doi: 10.1073/pnas.0711734105

Asadullah, K., Sterry, W., Stephanek, K., Jasulaitis, D., Leupold, M., Audring, H., et al. (1998). IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. *J. Clin. Invest.* 101, 783–794. doi: 10.1172/JCI1476

Azat, R., Liu, Y., Li, W., Kayir, A., Lin, D. B., Zhou, W. W., et al. (2016). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 17, 597–609. doi: 10.1631/jzus.B1500250

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., et al. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021

Barbosa, J., Ferreira, V., and Teixeira, P. (2009). Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products. *Food Microbiol.* 26, 527–532. doi: 10.1016/j.fm.2009.03.005

Ben Braïek, O., Cremonesi, P., Morandi, S., Smaoui, S., Hani, K., and Ghrairi, T. (2018). Safety characterisation and inhibition of fungi and bacteria by a novel multiple enterocin-producing *Enterococcus lactis* 4CP3 strain. *Microb. Pathog.* 118, 32–38. doi: 10.1016/j.micpath.2018.03.005

Benkerroum, N. (2013). Traditional fermented foods of north African countries: technology and food safety challenges with regard to microbiological risks. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12, 54–89. doi: 10.1111/j.1541-4337.2012.00215.x

Bernet, M. F., Brassart, D., Neeser, J. R., and Servin, A. L. (1994). *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 35, 483–489. doi: 10.1136/gut.35.4.483

Biaggini, K., Borrel, V., Szunerits, S., Boukherroub, R., N'Diaye, A., Zébré, A., et al. (2017). Substance P enhances lactic acid and tyramine production in *Enterococcus faecalis* V583 and promotes its cytotoxic effect on intestinal Caco-2/TC7 cells. *Gut Pathog.* 9:20. doi: 10.1186/s13099-017-0171-3

Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170

Bujnakova, D., Strakova, E., and Kmet, V. (2014). *In vitro* evaluation of the safety and probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from chicken and calves. *Anaerobe* 29, 118–127. doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.10.009

Cebrián, R., Baños, A., Valdivia, E., Pérez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M., and Maqueda, M. (2012). Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiol.* 30, 59–67. doi: 10.1016/j.fm.2011.12.002

Chauvière, G., Coconnier, M. H., Kerneis, S., Fourniat, J., and Servin, A. L. (1992). Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1689–1696. doi: 10.1099/00221287-138-8-1689

Chen, L., Zheng, D., Liu, B., Yang, J., and Jin, Q. (2016). VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis–10 years on. *Nucleic Acids Res.* 44, D694–D697. doi: 10.1093/nar/gkv1239

Christoffersen, T. E., Jensen, H., Kleiveland, C. R., Dørum, G., Jacobsen, M., and Lea, T. (2012). In vitro comparison of commensal, probiotic and pathogenic strains of *Enterococcus faecalis*. *Br. J. Nutr.* 108, 2043–2053. doi: 10.1017/S0007114512000220

Collado, M. C., Meriluoto, J., and Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 1065–1073. doi: 10.1007/s00217-007-0632

Courvalin, P. (2006). Antibiotic resistance: the pros and cons of probiotics. *Dig. Liver Dis.* 38, S261–S265. doi: 10.1016/S1590-8658(07)60006-1

Darling, A. C. E., Mau, B., Blattner, F. R., and Perna, N. T. (2004). Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res.* 14, 1394–1403. doi: 10.1101/gr.2289704

De Almeida, C. V., Taddei, A., and Amedei, A. (2018). The controversial role of *Enterococcus faecalis* in colorectal cancer. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 11:1756284818783606. doi: 10.1177/1756284818783606

Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., and Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 438–442. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x

Delley, M., Moliet, B., and Hottinger, H. (1990). DNA probe for *Lactobacillus delbrueckii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1967–1970.

Diarra, M. S., Rempel, H., Champagne, J., Masson, L., Pritchard, J., and Topp, E. (2010). Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. and characterization of isolates from broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 8033–8043. doi: 10.1128/AEM.01545-10

Diaz, M., Ladero, V., Del Rio, B., Redruello, B., Fernández, M., Martin, M. C., et al. (2016). Biofilm-forming capacity in biogenic amine-producing bacteria isolated from dairy products. *Front. Microbiol.* 7:591. doi: 10.3389/fmicb.2016.00591

Domann, E., Hain, T., Ghai, R., Billion, A., Kuenne, C., Zimmermann, K., et al. (2007). Comparative genomic analysis for the presence of potential enterococcal virulence factors in the probiotic *Enterococcus faecalis* strain Symbioflor 1. *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 533–539. doi: 10.1016/j.ijmm.2007.02.008

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., et al. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 386S–392S. doi: 10.1093/ajcn/73.2.386s

EFSA Panel on Biological Hazards, Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., et al. (2017). Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. *EFSA J.* 15:e04664. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4664

Elbehiry, A., Marzouk, E., Hamada, M., Al-Dubaib, M., Alyamani, E., Moussa, I. M., et al. (2017). Application of MALDI-TOF MS fingerprinting as a quick tool for identification and clustering of foodborne pathogens isolated from food products. *New Microbiol.* 40, 269–278.

Elo, S., Saxelin, M., and Salminen, S. (1991). Attachment of *Lactobacillus casei* strain GG to human colon carcinoma cell line Caco-2: comparison with other dairy strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 13, 154–156. doi: 10.1111/j.1472-765X.1991.tb00595.x

European Food Safety Authority [EFSA] (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.* 10, 2740–2749.

Extremina, C. I., Costa, L., Aguiar, A. I., Peixe, L., and Fonseca, A. P. (2011). Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. *J. Microbiol. Methods* 84, 167–173. doi: 10.1016/j.mimet.2010.11.007

Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., and De Vuyst, L. (2006). The role and application of *Enterococci* in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 1–24. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026

Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., and Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 125–140. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014

Franz, C. M., Stiles, M., Schleifer, K. H., and Holzapfel, W. H. (2003). Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 105–122. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00174-0

Fritzenwanker, M., Kuenne, C., Billion, A., Hain, T., Zimmermann, K., Goesmann, A., et al. (2013). Complete genome sequence of the probiotic *Enterococcus faecalis* Symbioflor 1 Clone DSM 16431. *Genome Announc.* 1:e00165-12. doi: 10.1128/genomeA.00165-12

Garcia-Gonzalez, N., Prete, R., Battista, N., and Corsetti, A. (2018). Adhesion properties of food-associated *Lactobacillus plantarum* strains on human intestinal epithelial cells and modulation of IL-8 release. *Front. Microbiol.* 9:2392. doi: 10.3389/fmicb.2018.02392

Goldin, B. R., and Gorbach, S. L. (1992). "Probiotics for humans," in *Probiotics. The Scientific Basis. Ž*, ed. R. Fuller (London: Chapman & Hall), 355–376. doi: 10.1007/978-94-011-2364-8_13

Gómez, N. C., Ramiro, J. M., Quecan, B. X., and de Melo Franco, B. D. (2016). Use of potential probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms formation. *Front. Microbiol.* 7:863. doi: 10.3389/fmicb.2016.00863

Haghshenas, B., Haghshenas, M., Nami, Y., Yari Khosroushahi, A., Abdullah, N., Barzegari, A., et al. (2016). Probiotic assessment of *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Enterococcus mundtii* 50H isolated from traditional dairies microbiota. *Adv. Pharm. Bull.* 6, 37–47. doi: 10.15171/apb.2016.07

Haigh, J., Degun, A., Eydmann, M., Millar, M., and Wilks, M. (2011). Improved performance of bacterium and yeast identification by a commercial matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry system in the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 49:3441. doi: 10.1128/JCM.00576-11

Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., and Hammami, R. (2018). The Genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns-an update. *Front. Microbiol.* 9:1791. doi: 10.3389/fmicb.2018.01791

Helwig, U., Lammers, K. M., Rizzello, F., Brigidi, P., Rohleder, V., Caramelli, E., et al. (2006). *Lactobacilli, bifidobacteria* and *E. coli* nissle induce pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. *World J. Gastroenterol.* 12, 5978–5986.

Hillion, M., Mijouin, L., Jaouen, T., Barreau, M., Meunier, P., Lefeuvre, L., et al. (2013). Comparative study of normal and sensitive skin aerobic bacterial populations. *Microbiologyopen* 2, 953–961. doi: 10.1002/mbo3.138

Khan, H., Flint, S., and Yu, P. K. (2010). Enterocins in food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 141, 1–10. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.005

Kimoto-Nira, H., Mizumachi, K., Nomura, M., Kobayashi, M., Fujita, Y., Okamoto, T., et al. (2007). *Lactococcus* sp. as potential probiotic lactic acid bacteria. Jpn. Agric. Res. Q. 41, 181–189. doi: 10.6090/jarq.41.181

Klaenhammer, T. R., and Kullen, M. J. (1999). Selection and design of probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 45–57. doi: 10.1016/S0168-1605(99)00076-8

Kristich, C. J., Rice, L. B., and Arias, C. A. (2014). "Enterococcal infection—treatment and antibiotic resistance," in *Enterococci: from Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, eds M. S. Gilmore, D. B. Clewell, Y. Ike, and N. Shankar (Boston, MA: Massachusetts Eye and Ear Infirmary).

Lauková, A., Marcináková, M., Strompfová, V., and Ouwehand, A. C. (2008). Probiotic potential of enterococci isolated from canine feed. *Folia Microbiol.* 53, 84–88. doi: 10.1007/s12223-008-0012-3

Li, B., Zhan, M., Evivie, S. E., Jin, D., Zhao, L., Chowdhury, S., et al. (2018). Evaluating the Safety of potential probiotic *Enterococcus durans* KLDS6.0930 using whole genome sequencing and oral toxicity study. *Front. Microbiol.* 29:1943. doi: 10.3389/fmicb.2018.01943

Lodemann, U., Strahlendorf, J., Schierack, P., Klingspor, S., Aschenbach, J. R., and Martens, H. (2015). Effects of the probiotic *Enterococcus faecium* and pathogenic *Escherichia coli* strains in a pig and human epithelial intestinal cell model. *Scientifica* 2015:235184. doi: 10.1155/2015/235184

Maekawa, T., Fukaya, R., Takamatsu, S., Itoyama, S., Fukuoka, T., Yamada, M., et al. (2018). Possible involvement of *Enterococcus* infection in the pathogenesis of chronic pancreatitis and cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 506, 962–969. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.169

Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Duprè, I., et al. (2003). Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 291–304. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00191-0

Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P., and Goker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14:60. doi: 10.1186/1471-2105-14-60

Messaoudi, S., Madi, A., Prévost, H., Feuilloley, M., Manai, M., Dousset, X., et al. (2012). *In vitro* evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Anaerobe* 18, 584–589. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.10.004

Mikheenko, A., Prjibelski, A., Saveliev, V., Antipov, D., and Gurevich, A. (2018). Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics* 34, i142–i150. doi: 10.1093/bioinformatics/bty266

Mundy, L. M., Sahm, D. F., and Gilmore, M. S. (2000). Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 513–522. doi: 10.1128/cmr.13.4.513-522.2000

Ness, I. F., Diep, D. B., and Ike, Y. (2014). "Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control," in *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]*, eds M. S. Gilmore, D. B. Clewell, Y. Ike, and N. Shankar (Boston, MA: Massachusetts Eye and Ear Infirmary).

Neuhaus, K., Lamparter, M. C., Zölch, B., Landstorfer, R., Simon, S., and Spanier, B. E. (2017). Probiotic *Enterococcus faecalis* Symbioflor down regulates virulence genes of EHEC in vitro and decrease pathogenicity in a *Caenorhabditis elegans* model. *Arch. Microbiol.* 199, 203–213. doi: 10.1007/s00203-016-1291-8

Nikolenko, S. I., Korobeynikov, A. I., and Alekseyev, M. A. (2013). BayesHammer: bayesian clustering for error correction in single-cell sequencing. *BMC Genomics* 14(Suppl. 1):S7. doi: 10.1186/1471-2164-14-S1-S7

Nueno-Palop, C., and Narbad, A. (2011). Probiotic assessment of *Enterococcus faecalis* CP58 isolated from human gut. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 390–394. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.029

Ogier, J. C., and Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 291–301. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.017

Ouwehand, A. C., Salminen, S., and Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 279–289. doi: 10.1023/A:1020620607611

Page, A. J., Taylor, B., and Keane, J. A. (2016). Multilocus sequence typing by blast from de novo assemblies against PubMLST. *J. Open Source Softw.* 1:118. doi: 10.21105/joss.00118

Palmer, K. L., Kos, V. N., and Gilmore, M. S. (2010). Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 632–639. doi: 10.1016/j.mib.2010.08.004

Park, J., Jin, G. D., Pak, J. I., Won, J., and Kim, E. B. (2017). Development of a rapid identification method for the differentiation of *Enterococcus* Species using a species-specific multiplex PCR based on comparative genomics. *Curr. Microbiol.* 74, 476–483. doi: 10.1007/s00284-017-1210-5

Pelletier, C., Bouley, C., Cayuela, C., Bouttier, S., Bourlioux, P., and BellonFontaine, M. N. (1997). Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1725–1731.

Pimentel, L. L., Mättö, J., Malcata, F. X., Pintado, M. E., and Saarela, M. (2012). Survival of potentially probiotic enterococci in dairy matrices and in the human gastrointestinal tract. *Int. Dairy J.* 27, 53–57. doi: 10.1016/j.idairyj.2012.07.008

Popović, N., Dinić, M., Tolinački, M., Mihajlović, S., Terzić-Vidojević, A., Bojić, S., et al. (2018). New insight into biofilm formation ability, the presence of virulence genes and probiotic potential of *Enterococcus* sp. dairy isolates. *Front. Microbiol.* 9:78. doi: 10.3389/fmicb.2018.00078

Pritchard, L. (2017). *PYANI: Python Module for Average Nucleotide Identity Analyses*. Available at: https://github.com/widdowquinn/pyani/releases/tag/v0.2.7 (accessed February 19, 2019).

Pritchard, L., Glover, R. H., Humphris, S., Elphinstone, J. G., and Toth, I. K. (2016). Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft rotting enterobacterial plant pathogens. *Anal. Methods* 8, 12–24. doi: 10.1039/C5AY02550H

Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C., and Lereclus, D. (2012). The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J. Vis. Exp.* 11:e4392. doi: 10.3791/4392

Ramos, C. L., Thorsen, L., Schwan, R. F., and Jespersen, L. (2013). Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiol.* 36, 22–29. doi: 10.1016/j.fm.2013.03.010

Reviriego, C., Eaton, T., Martin, R., Jimenez, E., Fernandez, L., Gasson, M. J., et al. (2005). Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *J. Hum. Lact.* 21, 131–138. doi: 10.1177/0890334405275394

Rosenberg, M., Gutnick, D., and Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 29–33. doi: 10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x

Salminen, S., Ouwehand, A. C., and Isolauri, E. (1998). Clinical applications of probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 8, 563–572. doi: 10.1016/S0958-6946(98)00077-6

Seemann, T. (2018). *abricate: Mass Screening of Contigs for Antimicrobial and Virulence Genes* (accessed February 19, 2019).

Semedo, T., Almeida Santos, M., Martins, P., Silva Lopes, M. F., Figueiredo Marques, J. J., and Tenreiro, R. (2003). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the cyl operon in enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2569–2576. doi: 10.1128/JCM.41.6.2569-2576.2003

Silvetti, T., Morandi, S., and Brasca, M. (2019). Does *Enterococcus faecalis* from traditional raw milk cheeses serve as a reservoir of antibiotic resistance and pathogenic traits? *Foodborne Pathog. Dis.*

Snel, J., Vissers, Y., Smit, B., Jongen, J., Van Der Meulen, E., Zwijsen, R., et al. (2011). Strain specific immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* strains on birch pollen allergic subjects out of season. *Clin. Exp. Allergy* 41, 232–242. doi: 10.1111/j.1365-2222.2010.03650.x

Sogawa, K., Watanabe, M., Sato, K., Segawa, S., Ishii, C., and Miyabe, A. (2011). Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 1905–1911. doi: 10.1007/s00216-011-4877-7

Tang, W., Bobeica, S. C., Wang, L., and van der Donk, W. A. (2018). CylA is a sequence-specific protease involved in toxin biosynthesis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*

Veljović, K., Popović, N., Miljković, M., Tolinaćki, M., Terzić-Vidojević, A., and Kojić, M. (2017). Novel aggregation promoting factor AggE contributes to the probiotic properties of *Enterococcus faecium* BGGO9-28. *Front. Microbiol.* 8:1843. doi: 10.3389/fmicb.2017.01843

Voravuthikunchai, S. P., Bilasoi, S., and Supamala, O. (2006). Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal lactobacilli. *Anaerobe* 12, 221–226. doi: 10.1016/j.anaerobe.2006.06.003

Wang, S., Hibberd, M. L., Pettersson, S., and Lee, Y. K. (2014). *Enterococcus faecalis* from healthy infants modulates inflammation through MAPK signaling pathways. *PLoS One* 9:e97523. doi: 10.1371/journal.pone.0097523

Wessels, D., Jooste, P. J., and Mostert, J. F. (1991). Technologically important characteristics of *Enterococcus* isolates from raw milk and dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 10, 349–352. doi: 10.1016/0168-1605(90)90082-G

Zheng, M., Zhang, R., Tian, X., Zhou, X., Pan, X., and Wong, A. (2017). Assessing the risk of probiotic dietary supplements in the context of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* 8:908. doi: 10.3389/fmicb.2017.00908

Zommiti, M., Cambronel, M., Maillot, O., Barreau, M., Sebei, K., Feuilloley, M. G., et al. (2018). Evaluation of probiotic properties and safety of *Enterococcus faecium* isolated from artisanal Tunisian meat 'Dried Ossban'. *Front. Microbiol.* 9:1685. doi: 10.3389/fmicb.2018.01685

Conflict of Interest Statement: KZ was employed by company SymbioPharm GmbH and provided the *E. faecalis* Symbioflor 1 strain as probiotic reference for the experiments.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Baccouri, Boukerb, Farhat, Zébré, Zimmermann, Domann, Cambronel, Barreau, Maillot, Rincé, Muller, Marzouki, Feuilloley, Abidi and Connil. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Genome announcement

Draft Genome Sequence of *Enterococcus faecalis* Strain OB15, a Probiotic Strain recently Isolated from "Tunisian Rigouta Cheese"

Olfa Baccouri[a]#, Amine M. Boukerb[b]#, Flore Nilly[b], **Mélyssa Cambronel[b]**, Issam Smaali[a], Marc G.J. Feuilloley[b], Ferid Abidi[a]#, Nathalie Connil[b]#

[a]Laboratory of Protein Engineering and Bioactive Molecules (LIP-MB), National Institute of Applied Sciences and Technology. University of Carthage, Tunis, Tunisia.

[b] Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) EA 4312, Université de Rouen Normandie, Normandie Université, Évreux F-27000, France.

Address correspondence to Amine M. Boukerb, amine.boukerb@univ-rouen.fr
#Olfa Baccouri and Amine M. Boukerb contributed equally to this work.

Abstract
Enterococcus faecalis OB15 is a probiotic strain that has been isolated from Rigouta, a popular traditional Tunisian fermented cheese. We report here the first draft genome sequence of this strain consisting of 2,914,202 bp with an average G+C content of 37.49%.

Draft Genome Sequence of *Enterococcus faecalis* Strain OB15, a Probiotic Strain recently Isolated from "Tunisian Rigouta Cheese"

Olfa Baccouri[a]#, Amine M. Boukerb[b]#, Flore Nilly[b], **Mélyssa Cambronel[b]**, Issam Smaali[a], Marc G.J. Feuilloley[b], Ferid Abidi[a]#, Nathalie Connil[b]#

[a]Laboratory of Protein Engineering and Bioactive Molecules (LIP-MB), National Institute of Applied Sciences and Technology. University of Carthage, Tunis, Tunisia.

[b] Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) EA 4312, Université de Rouen Normandie, Normandie Université, Évreux F-27000, France.

Address correspondence to Amine M. Boukerb, amine.boukerb@univ-rouen.fr
#Olfa Baccouri and Amine M. Boukerb contributed equally to this work.

Abstract
Enterococcus faecalis OB15 is a probiotic strain that has been isolated from Rigouta, a popular traditional Tunisian fermented cheese. We report here the first draft genome sequence of this strain consisting of 2,914,202 bp with an average G+C content of 37.49%.

Announcement

Enterococcus faecalis is a Gram-positive, facultative anaerobic bacterium. This microorganism is ubiquitous in environment, mainly found in the gastrointestinal tracts of humans and animals, but also widespread in soil, water, plants and dairy products (1). Several strains of *E. faecalis* are known to be opportunistic pathogens and are recognized among the major etiological agents of nosocomial and other human infections (endocarditis and urinary tract infections), due to their ability to acquire resistance to a wide range of antibiotics and the presence of virulence determinants (2, 3). In contrast, other strains have potential benefits for human health and are currently used as starter cultures in manufacturing cheese (4, 5), as bacteriocin (enterocins) producers in food preservation, and as potential probiotics in the food industry (1, 6).

E. faecalis OB15 was recently isolated from Rigouta, a popular traditional Tunisian fermented cheese, which is often prepared by boiling acidified cheese whey from cow's milk (7). These authors have characterized the probiotic potential and safety of this strain using physiological and genomic analysis and found that *E. faecalis* OB15 seems to be reliable for future probiotic use in food or feed industry.

Genomic DNA of *E. faecalis* OB15 was extracted from an overnight culture in MRS broth (37°C, static condition) with the GeneJET genomic DNA purification Kit (Thermo Scientific, France). Extracted DNA was quantified using the Qubit® fluorometer and double-stranded DNA (dsDNA) high-sensitivity (HS) assay kit according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific, USA). Libraries were prepared using the Nextera XT DNA sample kit (Illumina, San Diego, CA). Genomic sequencing was achieved using a MiSeq instrument (Illumina, San

Diego, CA) with a paired-end read length of 2 × 250 bp protocol (LMSM Evreux, Rouen Normandy University, France).

Default parameters were used except where otherwise indicated. The obtained 3,302,996 reads were trimmed using TrimGalore v.0.6.2 (8) and their quality checked with FastQC v.1.6 (9). *De novo* assembly was performed with Unicycler v.0.4.7 (10), and Quast v.5.0.0 (11) was used to check assembly consistency, such as the number of contigs, G+C content, N_{50} value, and the total size. Genome annotation was carried out using the Prokka pipeline v.1.14.0 (12). The Multilocus Sequence Typing (MLST) profile of OB15 was determined from the draft genome sequence using the software package MLST v.2.16.1 (13) based on the *Enterococcus faecalis* PubMLST database (https://pubmlst.org/efaecalis/). Antimicrobial mechanisms (e.g. enterocin production) were explored with BAGEL v.4 (14) and antiSMASH v.5 (15).

The draft genome sequence was at 204 × mean coverage and consists of 2,914,202 bp, with a mean G+C content of 37.49%, which was consistent to published *E. faecalis* genomes. The Unicycler assembler yielded 86 contigs with an N_{50} of 93,106 pb and the largest contig size of 243,537 pb. A total of 2825 coding sequences, 52 tRNA genes and 3 rRNA genes were predicted. MLST analysis identified OB15 with ST25. BAGEL4 and antiSMASH5 did not predict any known bacteriocin biosynthetic gene, although *E. faecalis* OB15 has been previously found to be active against *Listeria monocytogenes* (unpublished data).

Accession number(s)

The draft genome sequence of *E. faecalis* has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession number VOLU00000000. The version described in this paper is the first version VOLU00000000.1.

ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge the contribution of the Normandy Network of Microbial Metagenomics (RNAmb), supported by Région Normandie and European Union (FEDER).

References

1. Franz CM, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. 2003. Enterococci in foods--a conundrum for food safety. Int J Food Microbiol 88:105-22.

2. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. 1994. Virulence of enterococci. Clin Microbiol Rev 7:462-78.

3. Maekawa T, Fukaya R, Takamatsu S, Itoyama S, Fukuoka T, Yamada M, Hata T, Nagaoka S, Kawamoto K, Eguchi H, Murata K, Kumada T, Ito T, Tanemura M, Fujimoto K, Tomita Y, Tobe T, Kamada Y, Miyoshi E. 2018. Possible involvement of *Enterococcus* infection in the pathogenesis of chronic pancreatitis and cancer. Biochem Biophys Res Commun 506:962-969.

4. Franz CM, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Galvez A. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. Int J Food Microbiol 151:125-40.

5. Wessels D, Jooste PJ, Mostert JF. 1990. Technologically important characteristics of *Enterococcus* isolates from milk and dairy products. Int J Food Microbiol 10:349-52.

6. Foulquie Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. Int J Food Microbiol 106:1-24.

7. Baccouri O, Boukerb AM, Farhat LB, Zebre A, Zimmermann K, Domann E, Cambronel M, Barreau M, Maillot O, Rince I, Muller C, Marzouki MN, Feuilloley M, Abidi F, Connil N. 2019. Probiotic Potential and Safety Evaluation of *Enterococcus faecalis* OB14 and OB15, Isolated From Traditional Tunisian Testouri Cheese and Rigouta, Using Physiological and Genomic Analysis. Front Microbiol 10:881.

8. Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMB net journal 17.

9. Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/.

10. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. 2017. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. PLoS Comput Biol 13:e1005595.

11. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics 29:1072-5.

12. Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics 30:2068-9.

13. Seemann T. 2016. MLST: scan contig files against PubMLST typing schemes ; https://github.com/tseemann/mlst.git.

14. van Heel AJ, de Jong A, Song C, Viel JH, Kok J, Kuipers OP. 2018. BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. Nucleic Acids Res 46:W278-W281.

15. Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee SY, Medema MH, Weber T. 2019. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. Nucleic Acids Res 47:W81-W87.

Communications orales

CAMBRONEL M., HARDOUIN J., MAILLOT O., FEUILLOLEY M., BOUFFARTIGUES E., CONNIL N. Effect of epinephrine on *Pseudomonas aeruginosa*. Congrès Société Française de Microbiologie 2017, 09 au 11 Octobre 2017, Paris

CAMBRONEL M., HARDOUIN J., MAILLOT O., FEUILLOLEY M., BOUFFARTIGUES E., CONNIL N. Effect of epinephrine on *Pseudomonas aeruginosa*. 21ème journée de l'école doctorale de l'EdNBISE, 22 et 23 Mars 2018, Rouen.

BACCOURI O., ZEBRE A., ZIMMERMANN K., DOMANN E., **CAMBRONEL M**., BEN FARHAT L., MARZOUKI MN., FEUILLOLEY M., CONNIL N., ABIDI F. Probiotic properties of *Enterococcus faecalis* OB14 and OB15, isolated from Tunisian traditional fermented dairy products. 29ème forum international des Sciences Biologiques et de Biotechnologie. Association Tunisienne des Sciences Biologiques, 26 au 29 Mars 2018, Sousse, Tunisie.

BACCOURI O., MARTEL J., BEN FARHAT L., ZIMMERMANN K., DOMANN E., **CAMBRONEL M**., MARZOUKI M.N., FEUILLOLEY M., ABIDI F., CONNIL N. Safety evaluation of *Enterococcus faecalis* OB14 and OB15, isolated from Tunisian traditional fermented dairy products as future probiotics. Congrès de la Société Française de Microbiologie 2018, 01 au 3 Octobre 2018, Paris.

RODRIGUEZ S., **CAMBRONEL M**., MAILLOT O., LESOUHAITIER O., FEUILLOLEY M., CONNIL N. Réponse physiologique et génétique de *Pseudomonas aeruginosa* exposée à l'épinéphrine. Mini-colloque *Pseudomonas aeruginosa* 2019, 23 & 24 Septembre 2019, Grenoble.

Communications affichées

BACCOURI O**.,** BEN FARHAT L**.,** ZEBRE A., ZIMMERMANN K., DOMANN E., **CAMBRONEL M.,** MARZOUKI MN., FEUILLOLEY M., ABIDI F., CONNIL N. Probiotic properties of *Enterococcus faecalis* OB14 and OB15 isolated from tunisian traditional fermented dairy products. 2nd Probiotics Congress: Europe. 21-22 March 2018, Rotterdam, The Netherlands.

CAMBRONEL M., MAILLOT O**.,** FEUILLOLEY M**.,** CONNIL N**.** Physiological modulations of the pathogen *Enterococcus faecalis* MMH594 by epinephrine. Congrès Société Française de Microbiologie 2018, 01 au 03 Octobre 2018, Paris.

ZOMMITI M., **CAMBRONEL M.,** MAILLOT O., BARREAU M., SEBEI K., FEUILLOLEY M., FERCHICHI M., CONNIL N. Evaluation of probiotic properties and safety of *Enterococcus faecium* isolated from artisanal tunisian meat "Dried Ossban". Congrès Société Française de Microbiologie 2018, 01 au 3 Octobre 2018, Paris.

CAMBRONEL M., RODRIGUEZ S., MAILLOT O., HARDOUIN J., FEUILLOLEY M**.,** CONNIL N**.** Impact of epinephrine on the adherence and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa.* Congrès FEMS, 07 au 11 Juillet 2019, Glasgow, Écosse.

NILLY F., **CAMBRONEL M.,** BACCOURI O., BOUKERB A.M., RODRIGUEZ S., FEUILLOLEY M**.,** CONNIL N. Stress hormones increase biofilm formation of *Enterococcus faecalis*. 10th probiotics, prebiotics & new foods, nutraceuticals and botanicals for nutrition & human and microbiota health, 8-10 Septembre 2019, Universita Urbaniana, Rome, Italie

Mélyssa CAMBRONEL

6 rue Pierre Semard
27000 Evreux
-
03/07/1992
27 ans
-
Permis B

06 21 91 31 25

melyssa.cambronel@gmail.com

https://www.linkedin.com/in/mélyssa-cambronel-019614134

EXPERIENCE PROFESSIONNELLE

Octobre 2016 - Septembre 2019 - Laboratoire de microbiologie signaux et microenvironnement - Evreux, Eure - Doctorante en microbiologie

- Analyse de la réponse physiologique et génétique de *P.aeruginosa* et *E.faecalis* envers l'épinéphrine et identification de senseurs putatifs.

Gestion de projet – Autonomie
Communication (réunion, congrès en français/anglais) – Travail en équipe

Janvier 2016 – Juin 2016 - Laboratoire de microbiologie signaux et microenvironnement - Evreux, Eure - Stagiaire de Master 2

- Étude de l'effet des catécholamines sur *P. aeruginosa* et *E. faecalis.*

Avril 2015 – Juin 2015 - Laboratoire de microbiologie signaux et microenvironnement - Evreux, Eure - Stagiaire de Master 1

- Étude de l'effet du peptide natriurétique de type C et de l'opéron amidase sur la virulence et la formation de biofilm chez *P. aeruginosa.*

Avril 2013 – Juin 2013 - Entreprise U.C.I.B – Anet, Eure-et-Loir - Stagiaire de DUT

- Validation du dosage de l'acide glutamique par méthode enzymatique.

FORMATION

2016 – 2019 Doctorat en Microbiologie - Université de Rouen

2014 – 2016 Master de Microbiologie - Université de Caen

2013 – 2014 Licence de Biologie Fondamentale et Appliquée, option Microbiologie - Université de Caen

2010 – 2013 DUT Génie Biologie, Option Analyses Biologiques et Biochimiques - Université de Rouen - IUT d'Evreux

COMPETENCES TECHNIQUES

Microscopie
- Epifluorescence
- Confoncale à balayage laser

Physiologie bactérienne
- Gram négatif et positif
- Mobilité, biofilm, dosage de facteurs de virulence

Bio-informatique
- Gestion bibliographique (Mendeley)
- Base de données (Patric, MaGe…)
- Docking moléculaire (Autodock et Vina)

Biologie Cellulaire
- Lignée pulmonaire/intestinale (Caco2/TC7 et A549)
- Tests cytotoxiques (LDH, Rouge neutre)
- TER, translocation bactérienne et adhésion
- Test *in vivo* (*Caenorhabditis elegans*)

Protéomique
- Extraction protéique
- Electrophorèse bidimensionnelle

Biologie Moléculaire
- Extraction ARN et ADN
- PCR et RT-qPCR

COMPETENCES

Anglais
- Courant

Informatique
- Pack Office
- Windows Vista, 7, 8 et 10

Communication scientifique
- Conférences et rédaction de rapports (français et anglais)

Pédagogie
- Enseignement et encadrements de stagiaires

Vulgarisation scientifique
- Porteur de projet pour la Fête de la Science 2017

CENTRES D'INTERETS

Lecture
Thriller/Policier, Fantastique, Science-Fiction

Cinéma
Action, Aventure, Science-fiction, Thriller, Fantastique

Musique
Eclectique

Modélisme
Bateaux en bois

Résumé

L'endocrinologie microbienne a pour objet d'étude les interactions qui peuvent survenir entre les bactéries et les molécules sécrétées par l'hôte. *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis* sont deux pathogènes opportunistes impliqués dans des infections nosocomiales. Leur présence au sein du corps humain, les place donc au contact de molécules eucaryotes, dont les catécholamines (épinéphrine et norépinéphrine) qui sont produites en cas de réponse « *combat-fuite* » mais aussi lors de trauma, ou d'actes chirurgicaux. Ces substances sont connues pour être capables de moduler la physiologie bactérienne, notamment la virulence et la formation de biofilm. Les travaux menés au cours de cette thèse ont permis de montrer que l'épinéphrine pouvait moduler la physiologie de *P. aeruginosa* et de souches probiotiques et pathogènes d'*E. faecalis*. L'épinéphrine stimule, entres autres, la formation de biofilm et l'adhésion et pourrait, chez *P. aeruginosa,* jouer le rôle de xénosidérophore, favorisant ainsi la mise en place d'une infection par un apport de fer. Nous avons aussi émis l'hypothèse de la présence de senseurs adrénergiques putatifs, respectivement chez *P. aeruginosa* et *E. faecalis*, PmrB et VicK. Ces travaux de thèse ont permis d'approfondir les connaissances sur la communication hôte/pathogènes, et de mieux connaître l'effet de l'épinéphrine sur des bactéries présentes au sein du microbiote humain. Ceci pourrait permettre à l'avenir d'aider à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

Mot-clés: Endocrinologie microbienne, épinéphrine, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, virulence, senseurs

Summary

Microbial endocrinology studies the interactions that can occur between bacteria and molecules secreted by the host. *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* are two opportunistic pathogens involved in nosocomial infections. Their presence in the human body puts them in contact with eukaryotic molecules, including catecholamines (epinephrine and norepinephrine) which are produced in the event of a "*Fight of Flight*" response but also during trauma or surgical procedures. These substances are known to be able to modulate bacterial physiology, including virulence and biofilm formation. The present study has shown that epinephrine could modulate the physiology of *P. aeruginosa* and *E. faecalis* probiotic and pathogenic strains. Epinephrine stimulates, among other things, biofilm formation and adherence, and could play, in *P. aeruginosa,* the role of xenosiderophore, thus promoting the development of infection by iron intake. We also hypothesized the presence of putative adrenergic sensors in *P. aeruginosa* and *E. faecalis*, PmrB and VicK, respectively. This work has increased our knowledge on host/pathogen communication and the effect of epinephrine on bacteria within the human microbiota. This may help in the future to discover novel therapeutic targets.

Keywords: Microbial endocrinology, epinephrine, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, virulence, sensors