



HAL
open science

Rôle des sARN dans la pathogénie d'*Enterococcus faecium*

Sophie Reissier

► **To cite this version:**

Sophie Reissier. Rôle des sARN dans la pathogénie d'*Enterococcus faecium*. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2021. Français. NNT : 2021REN1B041 . tel-03623577

HAL Id: tel-03623577

<https://theses.hal.science/tel-03623577>

Submitted on 29 Mar 2022

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Microbiologie, Virologie, Parasitologie

Par **Sophie REISSIER**

Rôle des sARN dans la pathogénie d'*Enterococcus faecium*

Thèse présentée et soutenue à Rennes 1, le 26 novembre 2021

Unité de recherche : INSERM U1230 ARN régulateurs bactériens et médecine

Rapporteurs avant soutenance :

Nadine LEMAITRE PU-PH, Université Jules Verne Picardie
Lionel RIGOTTIER-GOIS CR, INRA – AgroParisTech

Composition du Jury :

Président : Vincent DUBEE PU-PH, Université d'Angers
Examineurs : Karine FAURE PU-PH, Université de Lille
 Nadine LEMAITRE PU-PH, Université Jules Verne Picardie
 Lionel RIGOTTIER-GOIS CR, INRA – AgroParisTech

Dir. de thèse : Vincent CATTOIR PU-PH, Université Rennes 1
Co-dir. de thèse : Matthieu REVEST PU-PH, Université Rennes 1

Invité : Jocelyne CAILLON MCU-PH, Université de Nantes

REMERCIEMENTS

« On peut trouver le bonheur même dans les moments les plus sombres. Il suffit de se souvenir, d'allumer la lumière. »

Ces trois années de recherche auront été riches en rebondissements scientifiques, et la rédaction de ce manuscrit rythmé par les nuits d'écriture. Ce projet n'aurait pu être mené à bien sans l'aide et le soutien de nombreuses « lumières » qu'il est temps de remercier.

Je remercie le Pr Nadine Lemaitre, le Pr Karine Faure, le Pr Vincent Dubée ainsi que le Dr Lionel Rigottier-Gois, d'avoir accepté de juger ce travail et de participer à ce jury. J'espère que ce travail vous plaira.

Je remercie également le Dr Jocelyne Caillon, d'avoir fait évoluer ce projet lors des comités de suivi de thèse et d'être présente pour la soutenance de ce travail.

Je remercie très chaleureusement le Pr Vincent Cattoir et le Pr Matthieu Revest. Merci de m'avoir encadrée sur ce projet et de votre disponibilité ainsi que pour toute l'aide apportée au cours de ces quatre dernières années. Travailler avec vous a été un réel plaisir, j'espère que ce travail sera à la hauteur de vos attentes.

Vincent, après les lapins...les souris ! Merci d'avoir monté ce projet et de m'avoir permis de le réaliser, j'ai pu confirmer mon envie de continuer sur cette voie. Merci de me pousser à toujours viser « plus haut », avec la même sympathie et bienveillance depuis bientôt dix ans.

Matthieu, ton approche clinique du projet a été très enrichissante et ton expérience « souris » précieuse. Merci également de ta bienveillance tout au long de ce travail.

J'ai une pensée pour le Pr Brice Felden, qui m'a accueillie dans son laboratoire de recherche et a permis à ce projet de voir le jour.

Je remercie également Valérie de m'avoir appris à amadouer les rongeurs. Merci d'avoir partagé ton savoir en expérimentation animale avec moi, et de m'avoir suivie dans la mise en place de ces nouveaux modèles.

Je tiens également à remercier toute l'équipe Inserm U1230, titulaires U et H-U, doctorants, aides labo... Merci pour votre accueil et votre aide technique et logistique.

Je remercie l'équipe de l'animalerie Arche, pour leur aide au quotidien.

Un grand merci à mes collègues amiénoises, de m'avoir libéré du temps pour la rédaction de ce manuscrit et pour la bonne humeur au quotidien.

Merci à mes parents et mon frère, soutien indéfectible depuis le début, et sans qui rien ne serait possible. Merci d'y croire, encore et toujours plus que moi, cela n'a pas de prix à mes yeux.

Merci à mes amis d'ici et d'ailleurs qui, parfois sans le savoir, ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce projet !

Merci Loren et Killian, la « Vingt Centimes », pour nos échanges scientifiques sur les entérocoques mais aussi, et surtout, pour tout le reste. Merci de m'avoir soutenue quand les rongeurs mettaient ma motivation à rude épreuve. Je vous souhaite tout le meilleur.

Merci Guillaume, de m'avoir accueillie à Rennes comme il se doit, pour les nombreux cafés et les « quelques » bières.

Merci Audrey pour ton aide, les heures passées à l'animalerie étaient bien plus sympathiques en ta compagnie.

Merci Sébastien, pour tous les bons moments partagés.

Merci les « amis du poney », Julie, Thidara, Julien, Carole, Alex, Christophe et Manon, de m'avoir permis de garder l'équilibre quoi qu'il advienne.

Mention spéciale à Carole, Loren et Killian, qui ont pris le temps de relire ce manuscrit.

TABLE DES MATIERES

ABBREVIATIONS UTILES	5
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES FOURNISSEURS	10
AVANT-PROPOS	11
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	13
1. Les entérocoques, bactéries commensales et opportunistes	14
1.1. Généralités.....	14
1.2. Pouvoir pathogène.....	16
1.3. Sensibilité aux antibiotiques et prise en charge thérapeutique.....	19
2. <i>E. faecium</i>, problème majeur de Santé Publique.	21
2.1. Souches commensales et pathogènes	22
2.2. Facteurs de virulence.....	23
2.3. Résistances aux antibiotiques	23
2.4. Épidémiologie hospitalière.....	26
3. Les ARN régulateurs	28
3.1. Définitions.....	28
3.2. Mécanismes d'action et fonctions.....	29
3.3. Entérocoques et sARN	33
4. Modèles expérimentaux sur l'animal	36
4.1. D'hier à aujourd'hui	36
4.2. Avantages et inconvénients.....	39
4.3. Les modèles d'étude d' <i>Enterococcus</i> spp.....	41
PROJET DE RECHERCHE	49
MISE AU POINT DES MODELES ANIMAUX	52
1. Colonisation intestinale	53
1.1. Animaux	54
1.2. Prérequis.....	54
1.3. Déroulement du protocole	57
1.4. Protocoles antibiotiques.....	58
1.5. Analyse statistique	60
1.6. Résultats	61
1.7. Discussion.....	63

2. Endocardite infectieuse	67
2.1. Animaux	67
2.2. Déroulement du protocole	67
2.3. Résultats et Discussion.....	68
3. Translocation bactérienne intestinale	71
3.1. Animaux	71
3.2. Protocoles et Interprétation des résultats.....	71
ÉTUDE D’Ern0160	80
1. Contexte	81
2. Objectifs et méthodologie.....	81
3. Principaux résultats.....	83
3.1. <i>In vitro</i>	83
3.2. <i>In vivo</i>	86
4. Discussion	88
5. Article.....	90
BIOLOGIE MOLECULAIRE	111
1. Sélection des sARN étudiés	112
2. Matériels et Méthodes.....	113
3. Ern0560.....	114
4. Ern0980.....	115
5. Ern2020.....	116
6. Discussion	117
BROMURE D’OTILONIUM	119
1. Composé	120
2. Animaux	120
3. Protocole.....	121
4. Résultats	122
5. Discussion	123
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	125
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	128
ANNEXES	139

ABBREVIATIONS UTILES

AAC : Aminoside-N-acétyltransférases

ANT : Aminoside-O-nucléotidyltransférases

APAFIS : Autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

APH : Aminoside-O-phosphoryltransférases

BEA : Bile-esculine-azide

BHI : *Brain-heart infusion*

BMF : Boulette de matières fécales

BMR : Bactérie multi-résistante

BO : Bromure d'otilonium

CC : Complexe clonal

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CSI : Concentration sub-inhibitrice

CTX : Cyclophosphamide

DO₆₀₀ : Densité optique à 600 nm

EI : Endocardite infectieuse

EfRV : *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine

ES : Début de phase stationnaire (*early stationary phase*)

IAS : Infection associée aux soins

IC : Index de compétition

ICn : Index de compétition normalisé

IP : (voie) intra-péritonéale

IV : (voie) intra-veineuse

LE : fin de phase exponentielle (*late exponential phase*)

ME : Milieu de phase exponentielle (*middle exponential phase*)

MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

PCR : *Polymerase chain reaction*

PE : Polyéthylène

PLP : Protéine liant les pénicillines

NFS : Numération formule sanguine

RACE : Amplification rapide des extrémités de l'ADN circulaire (*rapide amplification of cDNA ending*)

RBS : Site de fixation du ribosome (*Ribosome binding site*)

RT-qPCR : Amplification génique quantitative après couplée à une transcriptase inverse (*reverse transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction*)

sARN : ARN régulateur

SC : (voie) sous-cutanée

SPF : *Specific pathogen free*

TBI : Translocation bactérienne intestinale

TS : Trypticase-Soja

TSspec : gélose TS additionnée de spectinomycine

UFC : Unité formant colonie

WT : souche sauvage (*wild type*)

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. Évolution des Eucaryotes à travers les ères géologiques. (Van Tyne and Gilmore 2014)	14
FIGURE 2. Origine des entérocoques dans l'environnement. (Byappanahalli <i>et al.</i> , 2012).....	15
FIGURE 3. Répartition de l'inoculum bactérien dans le tube digestif (A) et schéma simplifié du mécanisme de translocation intestinale des entérocoques (B). (d'après Lebreton <i>et al.</i> , 2013) ...	16
FIGURE 4. Rôle de la flore intestinale dans l'infection à entérocoques.(Arias et Murray, 2012).....	18
FIGURE 5. Mécanismes de transmission hospitalière.(Arias et Murray, 2012)	19
FIGURE 6. Evolution des entérocoques au cours du temps. (d'après Garcia-Solache & Rice, 2019) ...	21
FIGURE 7. Analyse phylogénétique basée sur l'occurrence de SNP sur le génome de 73 souches de <i>E. faecium</i> de diverses niches. (Lebreton <i>et al.</i> , 2013).....	22
FIGURE 8. Evolution de la prévalence des EfRV en Europe. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2019).....	27
FIGURE 9. Représentation schématique des principaux mécanismes de régulation médiés par un sARN.....	30
FIGURE 10. sARN impliqués dans la résistance aux antibiotiques et molécules impactées. (Felden et Cattoir, 2018).....	32
FIGURE 11. Analyse comparative de 86 souches d' <i>E. faecium</i> concernant la présence ou l'absence de 61 sARN putatifs. (Siné <i>et al.</i> , 2017)	34
FIGURE 12. Expérimentations de Claude Bernard.....	37
FIGURE 13. Répartition des animaux utilisés en expérimentation animale en France, en 2019.	38
FIGURE 14. Modèles animaux mis au point pour l'étude des entérocoques, en fonction de la pathologie étudiée. (Goh <i>et al.</i> , 2017)	42
FIGURE 15. Représentation simplifiée de la physiopathologie de l'EI. (Holland <i>et al.</i> , 2016)	45
FIGURE 16. Végétations obtenues expérimentalement par induction d'une bactériémie secondairement à la pose d'un cathéter intracardiaque chez le rat (A) et le lapin (B).	46
FIGURE 17. Mode d'administration oral chez la souris.....	53
FIGURE 18. Composition de la flore intestinale des souris Swiss.....	55

FIGURE 19. Administration orale, non invasive, d'un volume contrôlé (Scarborough <i>et al.</i> , 2020). ...	56
FIGURE 20. Protocole de colonisation intestinale.	58
FIGURE 21. Modalités d'administration des différentes combinaisons d'antibiotiques.	60
FIGURE 22. Charge bactérienne moyenne des BMF en fonction du protocole antibiotique.	62
FIGURE 23. Anatomie du système digestif murin.	62
FIGURE 24. Charge bactérienne dénombrée dans les différents segments de l'intestin.	63
FIGURE 25. Protocole d'endocardite infectieuse.	68
FIGURE 26. Translocation bactérienne intestinale : protocole expérimental.	72
FIGURE 27. Charge bactérienne des reins (A), rates (B) et foies (C) des souris rendues neutropéniques (CTX) et témoins (T).	74
FIGURE 28. Translocation bactérienne intestinale : protocole expérimental modifié.	75
FIGURE 29. Charge bactérienne des reins (A), rates (B) et foies (C) des souris rendues neutropéniques (CTX) et témoins (T).	77
FIGURE 30. Courbes de croissances obtenues avec les souches WT et $\Delta 0160$ (A), $\Delta 0160_0160$ et $\Delta 0160_pAT29$ (B).	84
FIGURE 31. Co-culture WT – 0160.	85
FIGURE 32. Charge bactérienne moyenne contenue dans les BMF avec les souches WT et $\Delta 0160$ (A), $\Delta 0160_0160$ et $\Delta 0160_pAT29$ (B).	86
FIGURE 33. Co-colonisation avec les souches WT et $\Delta 0160$	87
FIGURE 34. Ern sélectionnés d'après l'étude de Sinel <i>et al.</i> , 2017 (Sinel <i>et al.</i> , 2017).	113
FIGURE 35. Résultats obtenus pour Ern0560.	115
FIGURE 36. Résultats obtenus pour Ern0980.	116
FIGURE 37. Résultats obtenus pour Ern2020.	117
FIGURE 38. Structure chimique du bromure d'otilonium.	120
FIGURE 39. Etude du bromure d'otilonium : protocole expérimental.	122
FIGURE 40. Charge bactérienne moyenne contenue dans les BMF en fonction du temps et de la molécule administrée.	123

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. Résultats des NFS obtenus avec le premier protocole et valeurs normales pour la souris Swiss (données fournisseur).....	73
TABLEAU 2. Résultats des NFS obtenus avec le deuxième protocole	76
TABLEAU 3. Coordonnées et niveau d'expression des Ern sélectionnés.....	112
TABLEAU 4. Coordonnées et taille des Ern sélectionnés déterminées par 5'3' race mapping	115

LISTE DES FOURNISSEURS

Médicaments

AMOXICILLINE : Panpharma S.A., Luitré-Dompierre, France
BROMURE D'OTILONIUM : Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis
CEFOXITINE : Panpharma S.A., Luitré-Dompierre, France
CEFTRIAXONE : Mylan, Canonsburg, Pennsylvanie, États-Unis
CLINDAMYCINE : Panpharma S.A., Luitré-Dompierre, France
CYCLOPHOSPHAMIDE : Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis
GENTAMICINE : Panpharma S.A., Luitré-Dompierre, France
KETAMINE (Imalgene® 1000) : Merial SAS, Lyon, France
SPECTINOMYCINE : Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis
TEICOPLANINE : Mylan, Canonsburg, Pennsylvanie, États-Unis
VANCOMYCINE : Mylan, Canonsburg, Pennsylvanie, États-Unis
XYLAZINE (Rompun 2%) : Bayer HealthCare SAS, Loos, France

Milieux de culture

FLACONS D'HEMOCULTURE (Bactec®) : Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, États-Unis
MILIEU TRYPTICASE-SOJA : Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis
MILIEU *BRAIN-HEART INFUSION* : Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis
MILIEU BILE-ESCULINE-AZIDE : Oxoid, groupe Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis

Animaux

SOURIS SWISS : Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France
RATS SPRAGUE-DAWLEY : Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France

AVANT-PROPOS

Depuis de nombreuses années, les entérocoques, bactéries du microbiote intestinal des hommes et des animaux, comptent parmi les premiers micro-organismes responsables d'infections liées aux soins. Ils sont en cause dans de nombreuses épidémies hospitalières avec notamment l'émergence d'isolats d'*Enterococcus faecium* résistants à la vancomycine. *E. faecium* est naturellement multi-résistant aux antibiotiques et possède une capacité d'adaptation métabolique importante lui permettant de supporter de nombreux stress environnementaux. Différents types de régulateurs semblent intervenir dans la transition entre le statut de bactérie commensale à celui de pathogène. Parmi eux, les ARN régulateurs (sARN) bactériens pourraient jouer un rôle critique. En effet, certains ont été impliqués dans différents mécanismes tels que la virulence, la résistance aux antibiotiques ou encore la production de biofilm. L'existence de ces sARN chez *E. faecium* a été démontrée récemment au laboratoire mais aucune donnée sur leur nature et leur implication dans les processus de colonisation et d'infection n'est disponible.

Ce travail de thèse s'inscrit dans la suite de ces travaux avec pour objectif la poursuite de la caractérisation des sARN d'*E. faecium*, avec la mise au point de modèles expérimentaux de colonisation et d'infection, afin d'évaluer leur implication dans ces deux mécanismes. Il a été réalisé au sein de l'UMR_S1230 « ARN régulateurs bactériens et médecine » (Université Rennes 1/Inserm), en collaboration avec le laboratoire associé « Entérocoques » affilié au Centre National de Référence « Résistance aux antibiotiques ».

La première partie de ce manuscrit sera consacrée à une revue de la littérature. Les caractéristiques d'*E. faecium*, bactérie commensale et opportuniste, ainsi que les sARN et les différents mécanismes dans lesquels ils sont impliqués seront abordés. Les modèles expérimentaux, leurs intérêts et limites seront ensuite développés. La seconde partie détaillera

les expérimentations et les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* lors de ce travail de thèse. Enfin, les perspectives qui découlent de ce projet seront discutées.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les entérocoques, bactéries commensales et opportunistes

1.1. Généralités

La notion d'entérocoque est apparue pour la première fois à la fin du 19^{ème} siècle. En 1899, Thiercelin décrit un cocci saprophyte du tube digestif pouvant être responsable d'infection [1]. La même année, MacCallum et Hastings décrivent quant à eux un micro-organisme similaire responsable d'une endocardite infectieuse [2]. Le genre *Enterococcus*, longtemps associé au genre *Streptococcus*, a été individualisé en 1984 et regroupe aujourd'hui plus de 50 espèces [3,4]. Les entérocoques sont des bactéries aéro-anaérobies facultatives, non sporulées, se présentant sous forme de cocci à Gram positif groupés en diplocoques ou en chaînettes de longueur variable. Ce sont des micro-organismes ubiquitaires, retrouvés notamment dans la flore intestinale normale des mammifères, et plus rarement au sein de la flore vaginale et buccale [5,6]. Leur présence a également été observée chez de nombreuses autres espèces animales et ce, depuis l'ère Paléozoïque (Figure 1) [7–9].

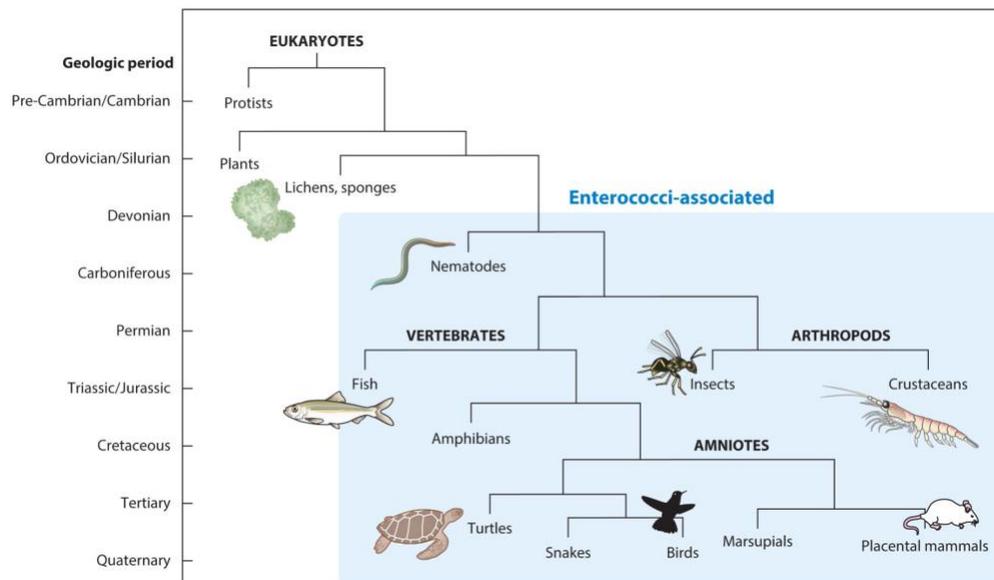


Figure 1. Évolution des Eucaryotes à travers les ères géologiques. (Van Tyne & Gilmore 2014) [8]
Le rectangle bleu représente la présence d'entérocoques au sein des différentes espèces.

Dans l'environnement, les entérocoques sont retrouvés associés à certaines plantes, dans le sol, les eaux usées, mais également les eaux douces et marines (Figure 2) [10–12]. Enfin, les entérocoques sont isolés dans de nombreux aliments tels que les produits laitiers [13].

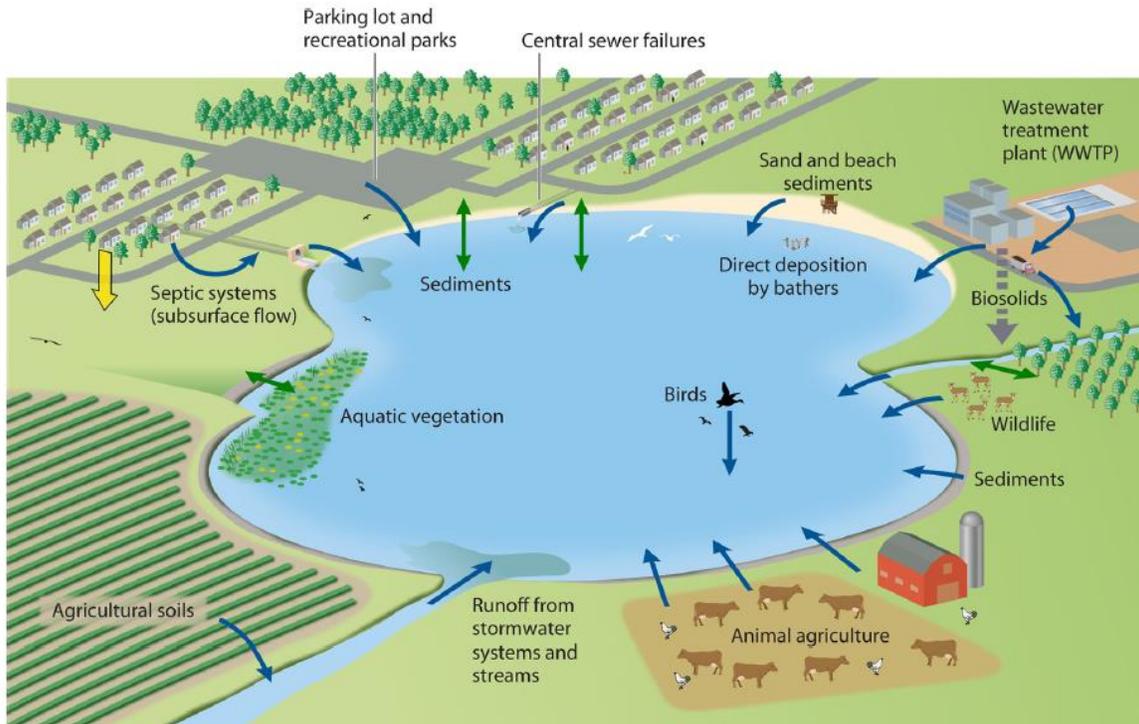


Figure 2. Origine des entérocoques dans l'environnement. (Byappanahalli *et al.* 2012) [12]

Cette ubiquité s'explique notamment par la forte capacité d'adaptation de ces bactéries aux divers stress environnementaux, comme les variations thermiques et ioniques ou le stress oxydant [14]. En effet, les entérocoques sont des bactéries peu exigeantes et se distinguent des streptocoques par leur capacité à se multiplier dans des conditions hostiles telles que le milieu hyper-salé (NaCl 6,5%), entre 10°C et 45°C, en présence de 40% de bile ou encore à pH = 9,6 [15].

Chez l'individu sain, le tube digestif est colonisé par le microbiote intestinal, qui est composé d'environ 10^{12} bactéries par gramme de selles. Il est majoritairement localisé au niveau de l'intestin grêle et du colon, sa composition variant en fonction du site anatomique. Du

duodénum au colon, on observe une diminution progressive des bactéries aérobies, remplacées par des bactéries anaérobies. Le colon contient la quantité la plus importante de bactéries, majoritairement anaérobies strictes. Les entérocoques sont les cocci à Gram positif les plus abondants du microbiote intestinal aérobie et représentent environ 1% de la flore colique (Figure 3A) [16,17]. Dans des conditions physiologiques, les micro-organismes cohabitent en symbiose avec l'organisme qu'ils colonisent et sont dits commensaux. Certains, dont font partie les entérocoques, sont dits opportunistes et peuvent, en cas de rupture de l'équilibre de la flore, notamment en cas de prise d'antibiotiques, se multiplier, traverser la barrière intestinale, proliférer à distance du tube digestif et être responsables d'une infection invasive (Figure 3B).

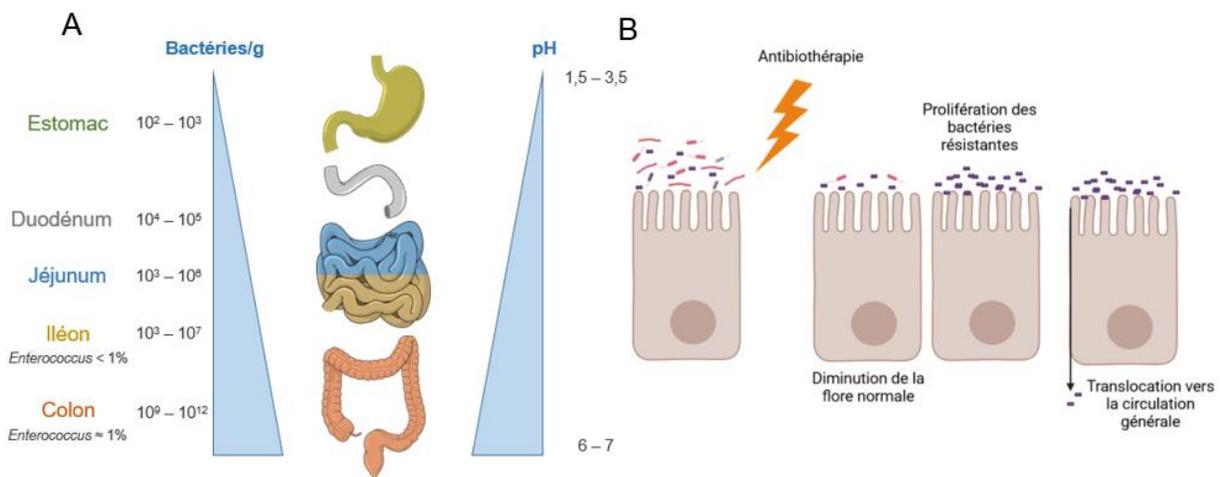


Figure 3. Répartition de l'inoculum bactérien dans le tube digestif (A) et schéma simplifié du mécanisme de translocation intestinale des entérocoques (B).

(D'après Lebreton *et al.*, 2014) [17]

1.2. Pouvoir pathogène

Parmi la cinquantaine d'espèces d'entérocoques identifiées à l'heure actuelle, une dizaine est impliquée en pathologie humaine. *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* représentent 95% des isolats cliniques. *E. faecalis* est le plus fréquemment isolé (environ 80% des cas) mais la prévalence des infections à *E. faecium* est en augmentation [18–20]. Les autres

espèces impliquées incluent *E. avium*, *E. caccae*, *E. casseliflavus*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae* et *E. raffinosus* [21]. Sur le plan clinique, les entérocoques sont isolés dans les infections urinaires, intra-abdominales, pelviennes, cutanées ou encore dans les bactériémies et endocardites et sont très fréquemment impliqués dans les infections liées aux soins (IAS).

- Infections urinaires

Les entérocoques sont majoritairement responsables d'infections urinaires basses, chez le sujet masculin et âgé. Ces infections surviennent fréquemment dans un contexte de séjour prolongé à l'hôpital ou dans un établissement de soins [22].

- Infections intra-abdominales et pelviennes

Les infections abdominales et pelviennes sont le plus souvent polymicrobiennes et associent des bactéries aérobies et anaérobies de la flore digestive. Le rôle pathogène des entérocoques, bien que fréquemment isolés, reste discuté notamment dans les infections communautaires [23–25]. A noter que des tableaux de péritonite à entérocoque sont rares mais décrits chez des patients cirrhotiques ou secondairement à une dialyse péritonéale [22,26,27]

- Infections cutanées

Très rarement isolés seuls, les entérocoques sont fréquemment associés dans les infections cutanées tels que les infections d'escarres ou de pied diabétique mais leur implication reste discutée [22,28].

- Bactériémies et endocardites infectieuses

Les entérocoques sont la 3^{ème} cause d'endocardite infectieuse derrière les staphylocoques et les streptocoques [29]. Elles surviennent de façon subaiguë, et touchent préférentiellement les patients âgés avec une porte d'entrée digestive ou urinaire. *E. faecalis* et *E. faecium* sont impliqués dans 90 à 97% et 1% des cas, respectivement.

- Infections associées aux soins

La majorité des infections à entérocoques sont endogènes et ont pour point de départ la flore du patient (Figure 4). Néanmoins, ils comptent parmi les premiers microorganismes responsables d'IAS depuis les années 1970 [20]. La contamination se fait alors par transmission manuportée *via* le personnel soignant ou les visiteurs, ou à partir de matériel médical ou de mobilier contaminé (Figure 5) [18].

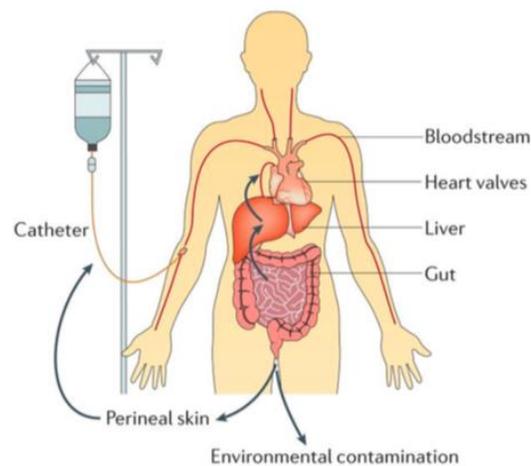


Figure 4. Rôle de la flore intestinale dans l'infection à entérocoques. (Arias & Murray) [18]

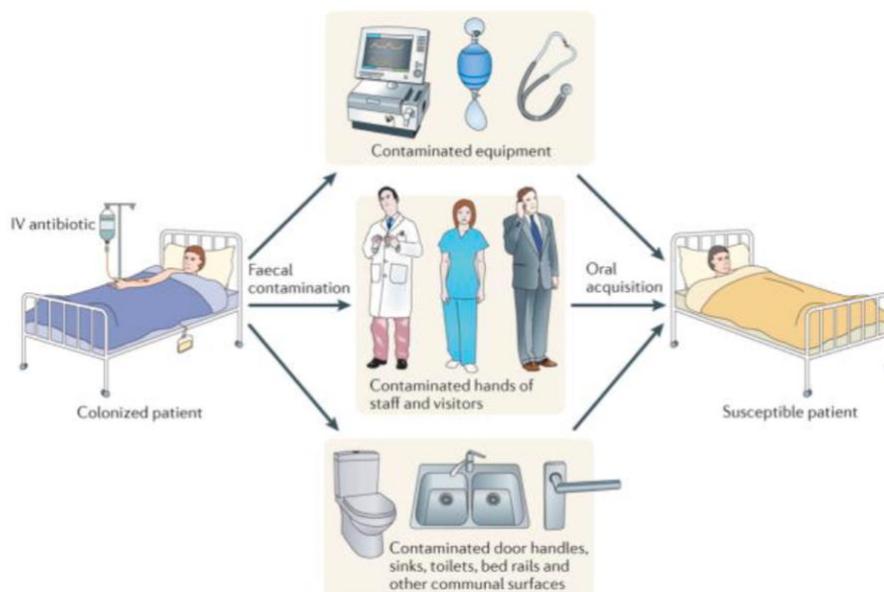


Figure 5. Mécanismes de transmission hospitalière. (Arias & Murray) [18]

En France, la dernière enquête de prévalence des IAS réalisée en 2017 place *E. faecalis* et *E. faecium* respectivement à la 3^{ème} et 11^{ème} position des microorganismes impliqués dans les IAS. Ils représentent à eux deux près de 8% des infections. Cette étude montre également une forte augmentation des IAS liées aux entérocoques depuis 2012, la prévalence ayant augmentée de près de 60% en cinq ans [30]. Aux États-Unis, les entérocoques sont responsables de 14% des IAS, *E. faecalis* et *E. faecium* occupant respectivement la 5^{ème} et la 9^{ème} place [31].

1.3. Sensibilité aux antibiotiques et prise en charge thérapeutique

Les entérocoques sont naturellement peu sensibles aux antibiotiques. Comme les streptocoques, ils présentent une résistance naturelle de bas niveau aux aminosides et sont de plus résistants aux céphalosporines et aux sulfamides. Les fluoroquinolones de 3^{ème} (lévofloxacine) et 4^{ème} génération (moxifloxacine) ont une activité limitée sur les entérocoques et sont peu utilisées en pratique. La famille des macrolides-lincosamides-streptogramines (MLS)

possède une activité anti-entérocoques mais de nombreuses résistances sont décrites, limitant ainsi leur utilisation [32,33].

E. faecalis étant exceptionnellement résistant à l'amoxicilline, la prise en charge des infections qu'il occasionne ne présente généralement pas de difficulté. En revanche, une grande majorité (80-90 %) des souches d'*E. faecium* a acquis une résistance de haut niveau aux aminopénicillines. La prise en charge des infections dues à ce germe repose donc sur l'utilisation des glycopeptides, notamment la vancomycine. Les aminosides peuvent être utilisés en association afin d'obtenir une synergie bactéricide. En cas de résistance aux glycopeptides, des antibiotiques de deuxième ligne tels que la daptomycine, le linézolide ou la tigécycline peuvent être utilisés. Néanmoins, ces antibiotiques sont relativement récents et les données sur leur efficacité clinique et les effets secondaires sont limitées. De plus, l'existence de résistance apparaissant sous traitement rend difficile la prise en charge de ces infections [34,35].

2. *E. faecium*, problème majeur de Santé Publique.

Bien qu'il soit moins fréquemment impliqué qu'*E. faecalis* en pathologie humaine, *E. faecium* représente à l'heure actuelle un problème de Santé Publique. D'une part, par ses capacités à s'adapter à de nombreux stress environnementaux et à acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques ; et d'autre part en raison de l'augmentation croissante de la prévalence des infections dues à ce pathogène. La chronologie des données détaillées dans ce chapitre, à savoir l'évolution des infections à *E. faecium*, l'usage des différents antibiotiques « anti-entérocoques » et l'apparition des premières souches résistantes sont synthétisés sur la Figure 6.

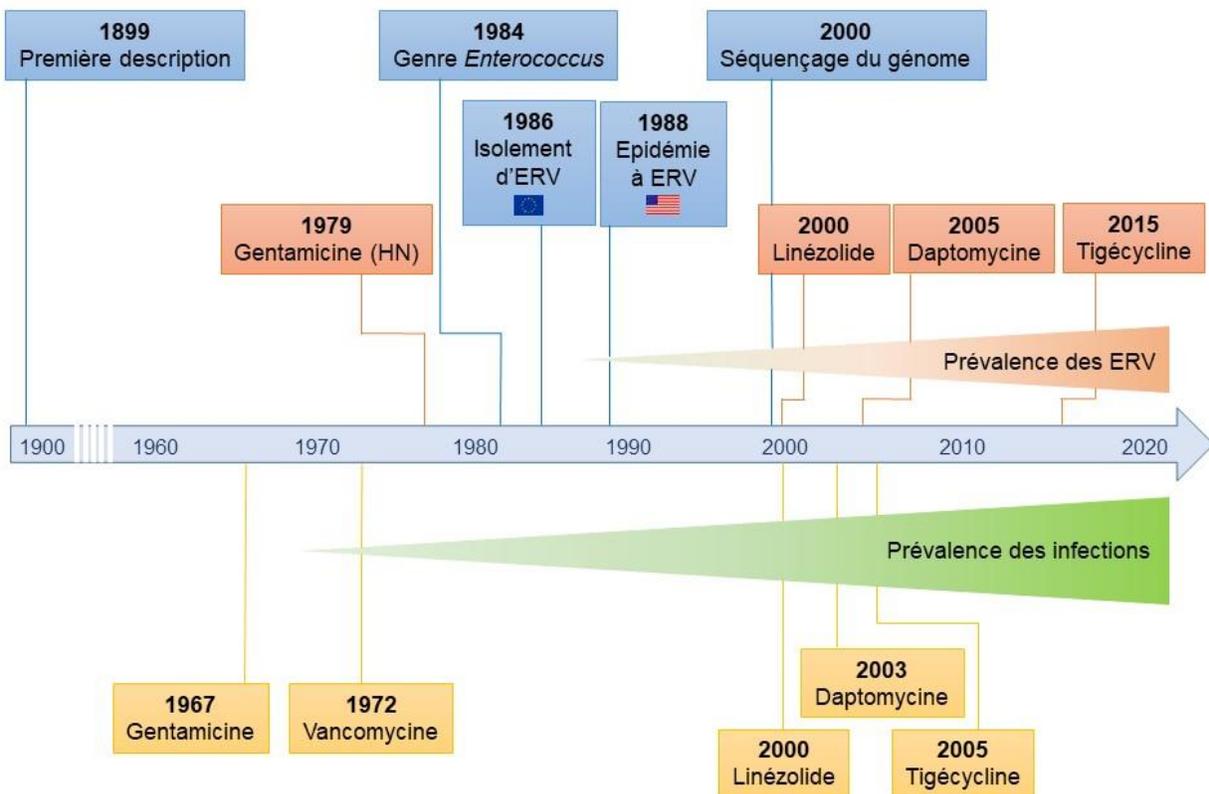


Figure 6. Evolution des entérocoques au cours du temps.

(D'après García-Solache & Rice, 2019) [36]

Les rectangles jaunes représentent le début de l'utilisation des antibiotiques, les rectangles oranges correspondent à l'apparition des premières résistances. ERV : *E. faecium* résistant à la vancomycine, HN : haut niveau.

2.1. Souches commensales et pathogènes

Les souches d'*E. faecium* sont répertoriées en trois clades selon leur pathogénicité et leur origine [37]. Le clade A regroupe les souches pathogènes et se divise en deux sous-groupes, les souches impliquées en pathologie humaine et responsables d'épidémies hospitalières (A1), et les souches responsables d'infections animales (A2). Le clade B rassemble les souches commensales, rarement pathogènes (Figure 7).

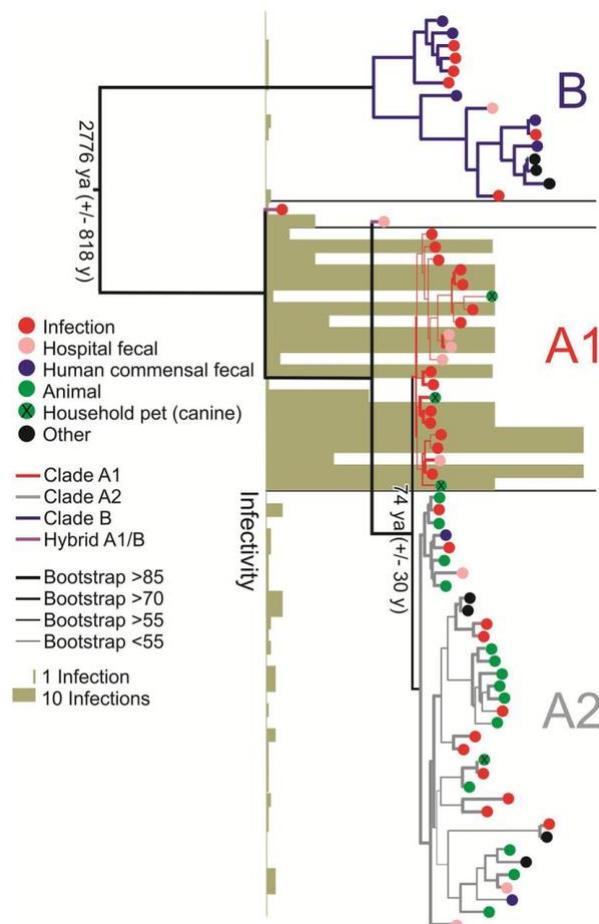


Figure 7. Analyse phylogénétique basée sur l'occurrence de SNP sur le génome de 73 souches de *E. faecium* de diverses niches. (Lebreton *et al.*, 2013) [37]

2.2. Facteurs de virulence

La pathogénicité d'*E. faecium* est relativement faible comparée à celle d'autres pathogènes comme les entérobactéries ou *Staphylococcus aureus*. Néanmoins, cette bactérie présente une capacité importante d'adaptation à son environnement, notamment au milieu hospitalier. Cinq catégories de facteurs de virulence impliqués dans la pathogénicité et l'adaptation à l'environnement ont été décrites chez *E. faecium*. Ainsi, on distingue les facteurs impliqués dans la formation du biofilm, l'adhésion, la production d'enzymes, l'échappement immunitaire et la production de peptides antimicrobiens [38]. En 2017, Goh *et al.* ont publié une synthèse des facteurs de virulence identifiés chez *E. faecalis* et *E. faecium* et validés *in vivo*. Au total, sur la centaine de facteurs recensés, la majorité était retrouvée chez *E. faecalis* et seuls 14 étaient mis en évidence chez *E. faecium* [19].

2.3. Résistances aux antibiotiques

L'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques est responsable de nombreux échecs thérapeutiques. Ces bactéries multi-résistantes (BMR), impliquées dans de nombreuses IAS et régulièrement responsables d'épidémies hospitalières, sont associées à une augmentation de la morbi-mortalité [39,40]. Le traitement des infections sévères à entérocoques repose principalement sur l'utilisation de l'amoxicilline et/ou de la vancomycine associées ou non à un aminoside. Cependant, *E. faecium* s'est progressivement adapté pour résister à ces molécules ainsi qu'aux antibiotiques dits de « deuxième ligne ».

- Résistance aux β -lactamines

Les β -lactamines regroupent les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames ainsi que certains inhibiteurs de β -lactamases. Ces antibiotiques, très largement utilisés, agissent sur la paroi bactérienne, en inhibant la synthèse du peptidoglycane par fixation

sur des enzymes communément appelées protéines liant les pénicillines (PLP) en raison de la forte affinité des pénicillines pour celles-ci. Les entérocoques produisent naturellement une PLP de moindre affinité, la PLP5. La présence de cette PLP5 confère aux entérocoques une résistance de haut niveau aux céphalosporines, et induit une augmentation des valeurs de concentrations minimales inhibitrices (CMI) des pénicillines [5]. Des modifications de la PLP5, qualitatives ou quantitatives, surviennent fréquemment chez *E. faecium*, entraînant une résistance de haut niveau à l'amoxicilline [41]. A l'heure actuelle, environ 80 % des souches d'*E. faecium* sont résistantes à l'amoxicilline en France et dans la majorité des pays européens [42].

- Résistance aux glycopeptides

La majorité des souches d'*E. faecium* étant résistantes à l'amoxicilline, les glycopeptides (en particulier la vancomycine) représentent le traitement de choix dans la prise en charge des infections dues à cette espèce. Les glycopeptides agissent également sur la paroi bactérienne en bloquant la synthèse du peptidoglycane. L'antibiotique se fixe sur l'extrémité D-Ala-D-Ala des précurseurs du peptidoglycane inhibant ainsi la poursuite de la synthèse du peptidoglycane. La résistance aux glycopeptides chez les entérocoques résulte de la modification de cette extrémité D-Ala-D-Ala, ce qui empêche la fixation de l'antibiotique. En revanche, cette extrémité modifiée reste reconnaissable par les enzymes de synthèse du peptidoglycane. Chez *E. faecium*, cette résistance est principalement médiée par les opérons *vanA* et *vanB* portés par les transposons Tn1546 et Tn1547, respectivement. La résistance VanA est caractérisée par une résistance inductible de haut niveau à la vancomycine et à la téicoplanine. Les souches de type VanB présentent un niveau variable de résistance à la vancomycine et restent sensibles à la téicoplanine [43].

- Résistance aux aminosides

Les entérocoques présentent naturellement une résistance de bas niveau aux aminosides. Cette résistance peut être contournée en utilisant les aminosides en association avec un antibiotique altérant la paroi comme les pénicillines ou les glycopeptides. La résistance aux aminosides est principalement enzymatique, avec la production de trois enzymes de type acétyl-transférase (AAC), nucléotidyl-transférase (ANT) ou phospho-transférase (APH). *E. faecium* produit naturellement une AAC(6')-II ainsi qu'une méthylase (EfmM) lui conférant une résistance à tous les aminosides sauf la gentamicine [44]. Les phénotypes de résistance dépendent des gènes de résistance acquis et des enzymes produites. De nombreuses souches d'*E. faecium* circulant au niveau hospitalier produisent ces enzymes, notamment l'enzyme bi-fonctionnelle AAC(6')-IIe-APH(2'')-IIa entraînant une résistance de haut niveau à tous les aminosides, y compris la gentamicine [45]. L'usage des aminosides, seuls ou en association, n'est alors plus une option thérapeutique.

- Résistance aux antibiotiques de deuxième ligne

- Daptomycine

La daptomycine est un lipopeptide calcium dépendant qui interagit avec la membrane cytoplasmique. Bien que rare, l'émergence de souches d'*E. faecium* résistantes à la daptomycine sous traitement est un phénomène décrit en clinique [46]. Différentes mutations impactant le fonctionnement de la membrane bactérienne interviennent dans cette résistance [47,48]. De façon plus inquiétante, une résistance à la daptomycine a été observée chez des souches d'*E. faecium* isolées de patients n'ayant jamais reçu de daptomycine [49].

- Linézolide

Le linézolide est un antibiotique anti-Gram positif, bactériostatique, appartenant à la classe des oxazolidinones, dont l'action repose sur l'inhibition de synthèse protéique. Plusieurs mécanismes de résistance ont été décrits, impliquant principalement des mutations de l'ARNr 23S ou

l'acquisition d'une méthylase (Cfr) [50–52]. Plus récemment, d'autres gènes de résistance, codant pour des protéines ABC (OptrA, PoxTA) ont été mis en évidence [52,53].

- Tigécycline

La tigécycline est une glycylycylcline, tétracycline de 3^{ème} génération dérivée de la minocycline. C'est un antibiotique bactériostatique inhibant la synthèse protéique, avec un spectre d'action très large incluant des bactéries à Gram positif et négatif. Plusieurs mécanismes de résistance sont décrits chez *E. faecium*, impliquant la surexpression des gènes codant des protéines d'efflux et de protection ribosomale impliquées dans la résistance aux tétracyclines. En effet l'activité des tétracyclines de 3^{ème} génération n'est pas affectée si ces gènes sont exprimés sans surexpression [54–57].

2.4. Épidémiologie hospitalière

Depuis la fin des années 1970, l'incidence des infections à entérocoques et notamment les IAS est en constante augmentation en Europe et aux États-Unis [18,36,58]. Cette augmentation peut, entre autres, s'expliquer par leur capacité à s'adapter à des milieux divers, et à acquérir des facteurs de virulence (*E. faecalis*) ou des gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques (*E. faecium*) [8]. A l'heure actuelle, la majorité des souches d'*E. faecium* circulant au niveau hospitalier appartiennent au complexe clonal (CC) 17. Elles ont notamment en commun une résistance de haut niveau à l'amoxicilline et aux fluoroquinolones. Les premières souches d'*E. faecium* résistantes à la vancomycine (EfRV) ont été décrites à la fin des années 1980 au Royaume-Uni et en France, et ont ensuite largement diffusé à travers le monde, notamment aux États-Unis [59,60]. A l'heure actuelle, près de 80 % des souches hospitalières d'*E. faecium* isolées aux États-Unis sont résistantes à la vancomycine [34,61]. En 2009, Louis B Rice a réuni six pathogènes multi résistants aux antibiotiques sous l'acronyme ESKAPE [*E. faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.]

[62]. Les EfRV appartiennent à ce groupe pour lequel il devient urgent de développer de nouvelles thérapies anti-infectieuses afin d'éviter une impasse thérapeutique [63,64]. En Europe, la prévalence de ces souches est variable selon les pays mais devient préoccupante. En 2010, seuls le Luxembourg et l'Irlande comptaient plus de 25% d'EfRV ; en 2019 ces souches représentent plus d'un quart des souches d'*E. faecium* dans la plupart des pays d'Europe de l'Est (Figure 8) [42]. En France la prévalence des EfRV reste faible (<1%).

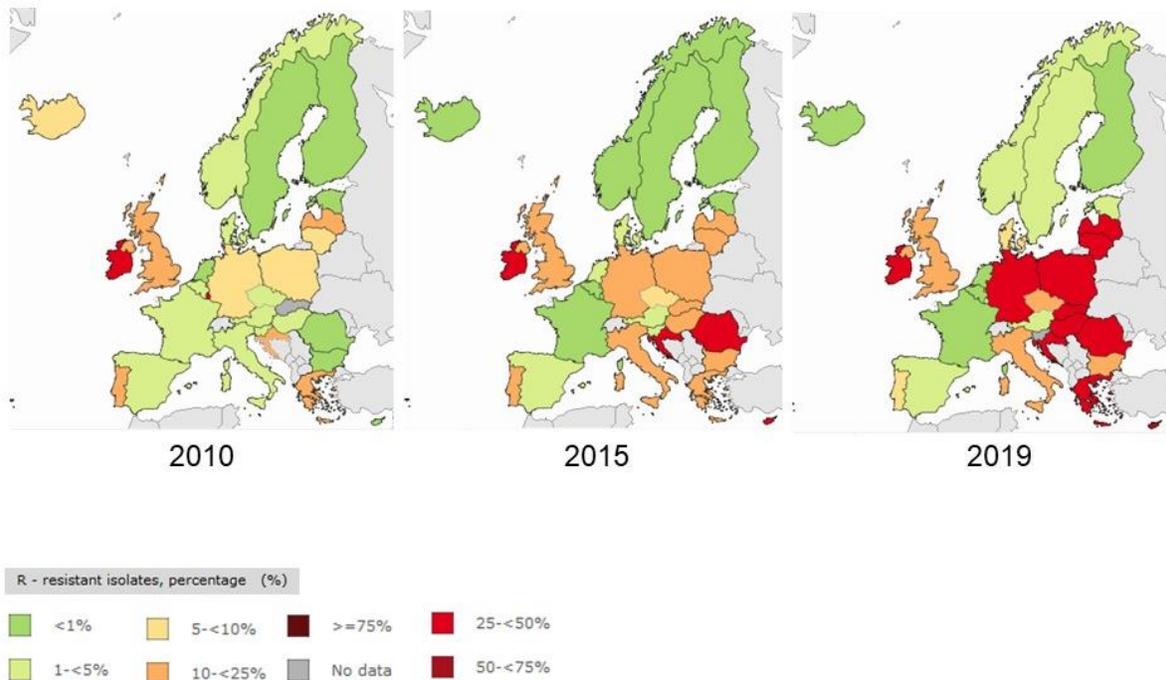


Figure 8. Évolution de la prévalence des EfRV en Europe.
(European Centre for Disease Prevention and Control, 2019) [42]

3. Les ARN régulateurs

E. faecium est une bactérie commensale qui peut, dans certaines conditions, devenir pathogène. Pour ce faire, l'adaptation à l'environnement dans lequel elle évolue est une étape cruciale. Cette capacité d'adaptation est une caractéristique commune aux bactéries, leur permettant de survivre dans des conditions de stress variées telles que le stress antibiotique ou les différents stress métaboliques. De nombreux mécanismes de régulation génétique entrent alors en jeu, et leur compréhension est aujourd'hui indispensable pour appréhender et optimiser la prise en charge des infections bactériennes. Ainsi, des systèmes de régulation existent à chaque étape entre la séquence nucléotidique et l'effet produit par la protéine. La régulation peut avoir lieu lors de l'initiation de la transcription ou de l'élongation transcriptionnelle, on parlera alors de régulation post-transcriptionnelle. L'étape de la traduction peut également être régulée, de même que la protéine produite (régulation post-traductionnelle) [65]. Le rôle des ARN régulateurs bactériens (sARN) dans ces mécanismes de régulation est de plus en plus décrit.

3.1. Définitions

La définition des sARN varie selon les auteurs. Dans ce travail nous les définirons comme des ARN ayant une taille comprise entre 50 et 500 nucléotides, généralement non codants, qui interagissent avec d'autres ARN ou des protéines, dans des conditions environnementales spécifiques [66]. Les sARN peuvent intervenir dans la régulation post-transcriptionnelle, traductionnelle ou post-traductionnelle [67,68]. On distingue les sARN « *cis* » et « *trans* ». Les régulateurs ayant une action dite en *cis* sont situés sur le même locus que leur cible, l'interaction avec la cible sera forte grâce à une complémentarité parfaite avec l'ARN cible. Les sARN ayant une action en *trans* sont quant à eux situés sur un locus à distance de leurs cibles qui peuvent être multiples, l'interaction sera plus faible en raison d'une complémentarité imparfaite des séquences [69]. Un sARN peut avoir une action en *cis* pour une cible et en *trans* pour une autre.

3.2. Mécanismes d'action et fonctions

Trois principaux mécanismes d'interaction entre le sARN et sa cible sont décrits et représentés sur la Figure 9 :

- Régulation traductionnelle au niveau ou à proximité du site de fixation du ribosome (RBS)

Le sARN peut être situé au niveau du RBS et ainsi empêcher la fixation du ribosome, et l'initiation de la traduction. Il peut également être situé à proximité d'un RBS initialement séquestré. Il modifie alors la conformation de l'ARN, libère le RBS et induit la traduction.

- Régulation de l'étape d'élongation (régulation post-transcriptionnelle)

Le sARN peut selon sa localisation favoriser la terminaison ou à l'inverse empêcher la formation d'une tige-boucle terminatrice.

- Régulation post-transcriptionnelle liée à l'activité de la RNase

Un sARN peut, s'il est localisé au niveau du site de restriction, stabiliser l'ARN et ainsi empêcher la dégradation de l'ARN ciblé par la RNase. Inversement il peut favoriser le recrutement d'une RNase et favoriser la dégradation de l'ARN cible.

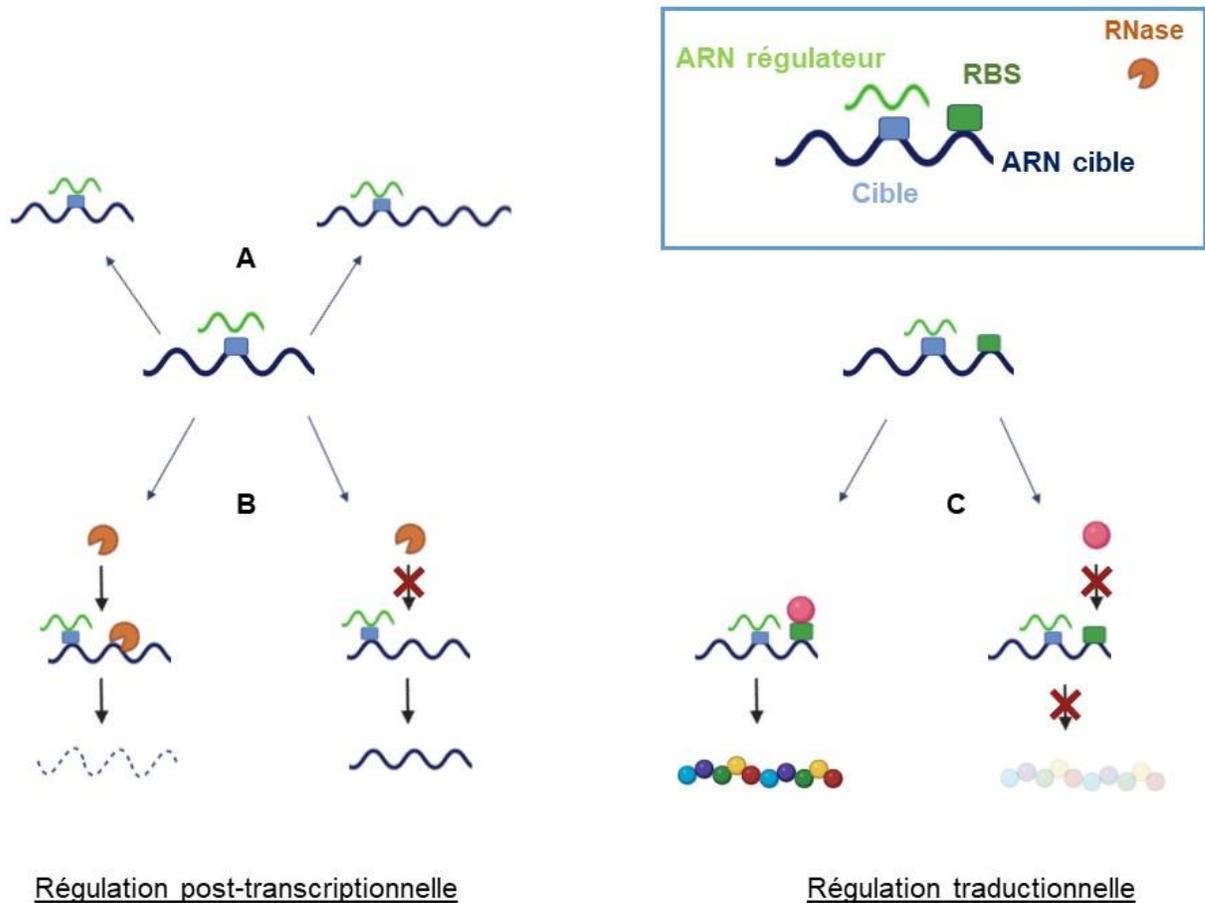


Figure 9. Représentation schématique des principaux mécanismes de régulation médiés par un sARN.

(A) Arrêt ou initiation de l'élongation, (B) Protection contre la RNase / recrutement de la RNase impactant la dégradation de l'ARN, (C) Libération ou séquestration du RBS impactant la fixation du ribosome

Le rôle phénotypique des sARN sera fonction de la cible qu'ils régulent. Ils peuvent ainsi intervenir dans la régulation de fonctions très variées :

- Mécanismes de virulence

Les mécanismes de virulence des bactéries sont très variés. Des sARN régulant ces mécanismes ont été décrits chez plusieurs espèces. C'est notamment le cas de MavR, présent chez les

entérobactéries et impliqué dans l'expression des gènes de virulence des souches d'*Escherichia coli* entérohémorragiques ou de MarS régulant la synthèse de la capsule et la virulence de *Streptococcus pyogenes* [70,71].

- Métabolisme cellulaire et réponse au stress

Les bactéries sont soumises à de nombreux stress environnementaux et ont développé de nombreux systèmes pour y faire face. Les sARN font partie de ces systèmes de réponse. On citera par exemple RyhB et PrrF1/2 impliqués dans le métabolisme du fer d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* respectivement [66,72] ; MicA, RyhB et MicL régulant la synthèse de protéines membranaires en réponse à un stress membranaire externe [73] ; ou encore SgrS qui intervient dans le métabolisme du glucose en réduisant l'accumulation de glucose-6-phosphate intracellulaire [74].

- Formation de biofilm

De nombreux sARN interviennent dans la régulation de la formation de biofilm. Chez *E. coli*, sept sARN (OmrA, OmrB, RprA, McaS, GcvB, RydC et RydB) régulent le facteur de transcription CsgD qui intervient dans la synthèse de la matrice du biofilm [75].

- Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques repose sur trois systèmes, l'inactivation enzymatique, la modification ou protection de la cible entraînant une diminution d'affinité de l'antibiotique et la diminution de la concentration intracellulaire de la molécule par imperméabilité ou efflux actif. De nombreux sARN sont impliqués dans chacun de ces processus [76] ; Ils sont synthétisés sur la Figure 10.

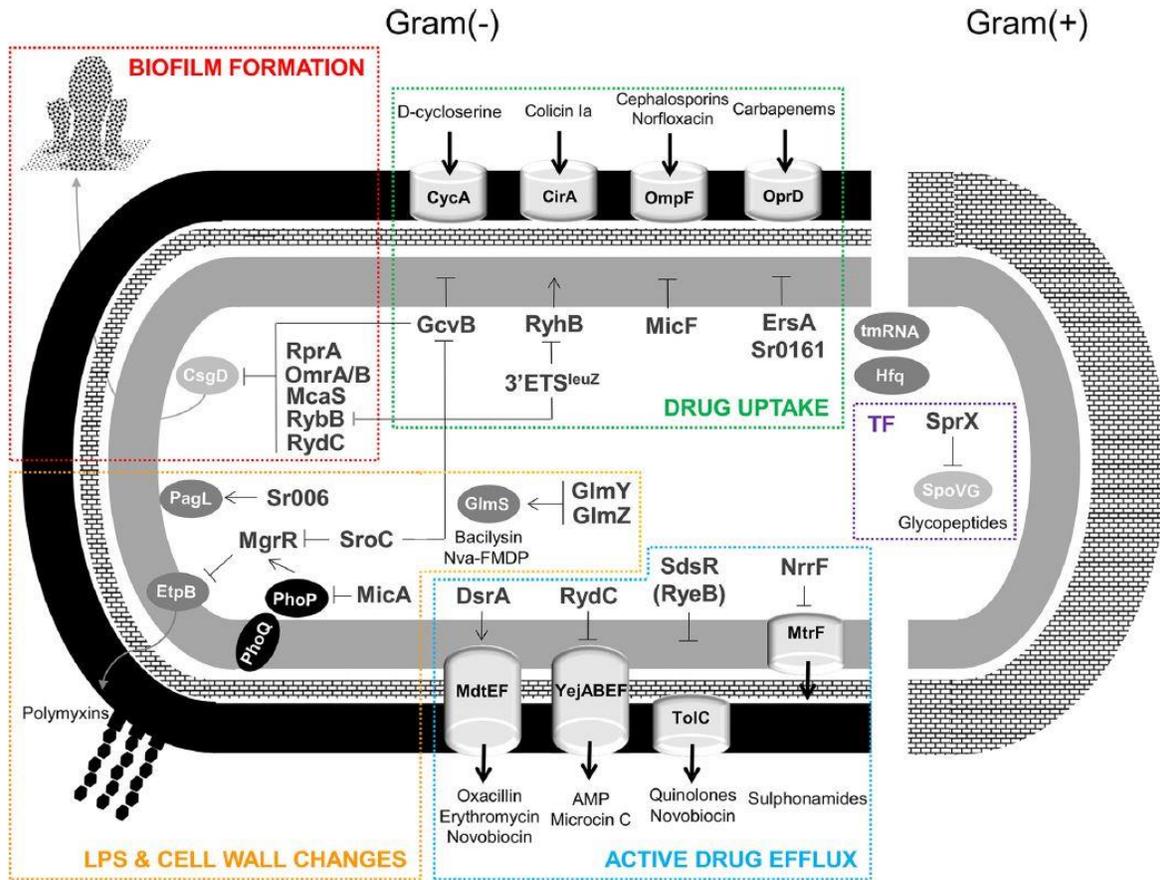


Figure 10. sARN impliqués dans la résistance aux antibiotiques et molécules impactées.

(Felden & Cattoir 2018) [76]

Les sARN sont regroupés en 5 sous-groupes selon le mécanisme régulé. [Rouge] formation de biofilm, [vert] imperméabilité membranaire, [bleu] efflux actif, [jaune] modifications de la paroi ou de la membrane, [violet] facteurs de transcription (effet global). Les flèches indiquent une régulation positive, les lignes brisées une régulation négative.

A l'heure actuelle de nombreux travaux portent sur les sARN bactériens, la majorité d'entre eux ayant été réalisés chez les entérobactéries. Ainsi, chez certaines bactéries comme *E.coli*, les mécanismes d'action et les cibles de certains sARN sont en partie élucidés. Pour de nombreuses autres bactéries, dont font partie les entérocoques, la présence de sARN a été mise en évidence mais des études supplémentaires sont nécessaires pour identifier leur cible et leur fonction.

3.3. Entérocoques et sARN

Récemment, les sARN ont été identifiés chez *E. faecalis*. Quatre-vingt-cinq sARN putatifs ont été mis en évidence par une analyse globale par transcriptomique modifiée [77]. Précédemment, plusieurs équipes avaient démontré l'existence d'ARN non codants, dont certains impliqués dans la virulence [78–80].

En 2017, les premiers sARN de l'espèce *E. faecium* ont été mis en évidence [81]. Soixante et un sARN putatifs ont été identifiés, dont certains probablement en lien avec la résistance aux antibiotiques, par une analyse transcriptomique comparative en absence ou présence de concentrations sub-inhibitrices (CSI) de daptomycine. Les sARN candidats les plus exprimés étaient sRNA_0160, sRNA_0280 et sRNA_1300. Ces sARN candidats ainsi que sept autres, ont ensuite été validés par Northern-Blot et qRT-PCR. L'expression de six d'entre eux était modifiée en présence de daptomycine. L'expression des sRNA_0560, sRNA_1420 et sRNA_2290 était diminuée alors que celle des sRNA_0160, sRNA_0170, sRNA_0290 était augmentée. Les auteurs ont également évalué la conservation de ces sARN au sein de 86 souches d'*E. faecium* séquencées appartenant aux trois clades A1, A2 et B (Figure 11). Plus de la moitié des sARN étaient conservés dans toutes les souches et 13 étaient absents du clade B (souches commensales). Parmi les dix sARN validés, la plupart de ces sARN étaient identifiés chez les 86 souches étudiées et semblent appartenir au core-genome. Ces premiers résultats laissent supposer l'implication de certains de ces sARN dans la réponse au stress antibiotique. Le fait que certains sARN soient absents des souches étudiées appartenant au clade B suggère un potentiel rôle dans la pathogénicité d'*E. faecium*.

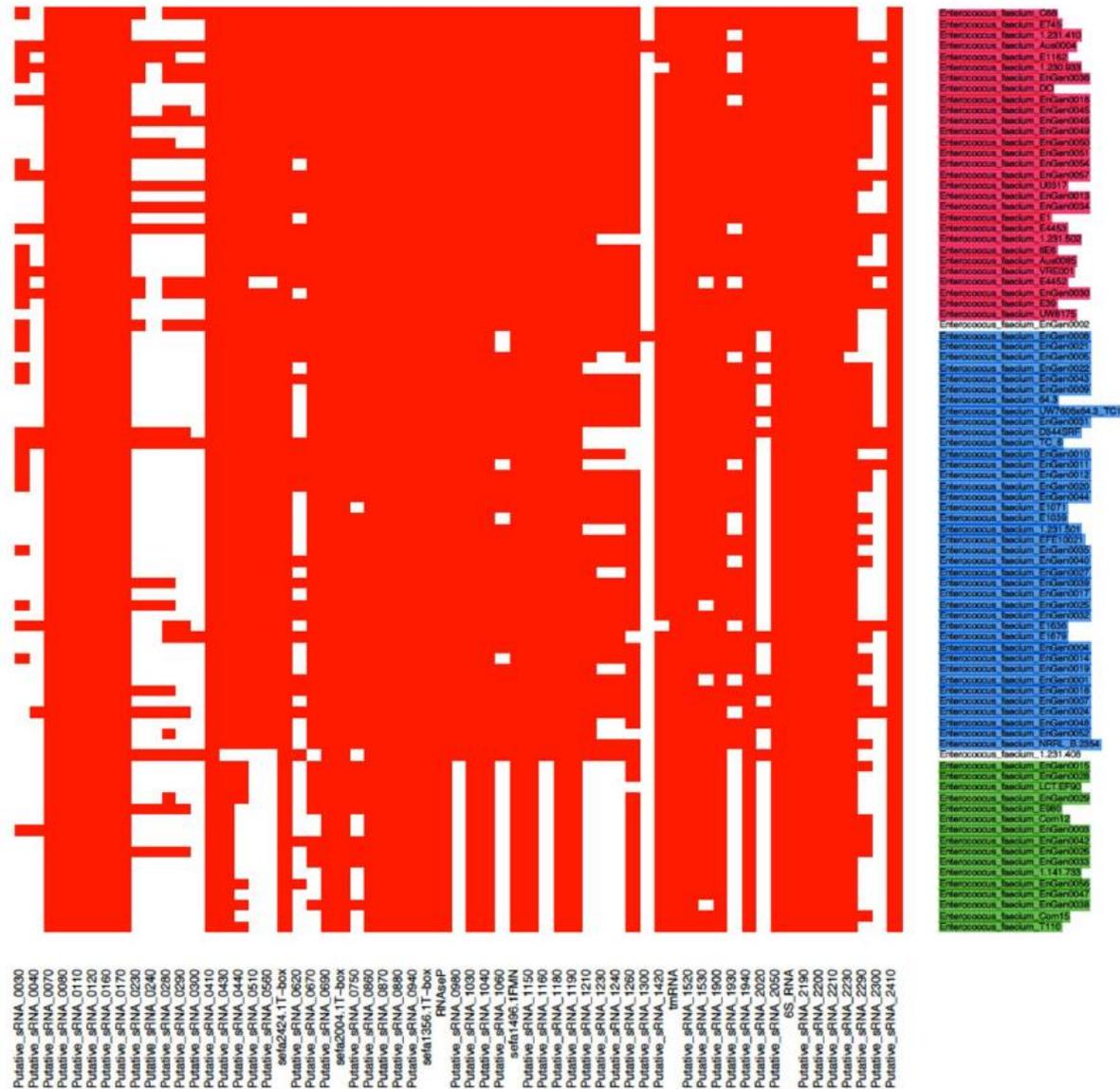


Figure 11. Analyse comparative de 86 souches d’*E. faecium* concernant la présence ou l’absence de 61 sARN putatifs. (Sinel *et al.*, 2017) [81]

La présence est représentée en rouge et l’absence en blanc. Les clades A1, A2 et B sont représentés en rose, bleu et vert respectivement

Très récemment, de nouveaux sARN ont été identifiés chez *E. faecalis* et *E. faecium* par une méthode de RNAseq différentielle couplée à une prédiction du site d’initiation, et certains ont été validés par Northern-Blot dans plusieurs conditions de stress (oxydatif, acide, osmotique et en présence de sels biliaires) [82].

Ces dernières années de nombreux sARN putatifs ont été identifiés chez *E. faecium* sans pour autant déterminer leur implication fonctionnelle. L'objectif de ce travail de thèse était de poursuivre l'étude de ces sARN et de mettre au point des outils pour leur exploration *in vivo*. Pour plus clarté les sARN d'*E. faecium* seront nommés « Ern » pour *Enterococcus* ribonucleic acid.

4. Modèles expérimentaux sur l'animal

L'utilisation d'animaux pour répondre à des questions scientifiques est une pratique ancienne, exploitée dans de nombreux domaines, de la recherche fondamentale au développement de nouvelles molécules.

4.1. D'hier à aujourd'hui

Que ce soit dans l'optique de comprendre la physiologie du corps humain, d'appréhender les différentes maladies auxquelles il peut être confronté ou encore de développer de nouvelles molécules, l'utilisation d'animaux à des fins expérimentales existe depuis l'antiquité [83]. Au IV^{ème} siècle avant J.-C., Hippocrate décrit la Théorie des humeurs et oppose ainsi une médecine « rationnelle » à la médecine religieuse et magique de l'époque. Dès lors, ses travaux puis ceux d'autres scientifiques tels Aristote ou encore Érasistrate de Céos, considéré comme le fondateur de la physiologie expérimentale et de l'école de médecine d'Alexandrie, ont recours aux animaux dans leurs recherches. En effet, l'école de médecine d'Alexandrie est célèbre, entre autres, pour ses dissections ou vivisections en public sur des animaux ou des condamnés. Plus tard, Galien utilisera de nombreux animaux (mammifères, oiseaux ou encore reptiles) pour décrire l'anatomie et le fonctionnement du corps humain dans son ouvrage *Pratiques anatomiques*. Il s'agit à cette époque, non pas d'expérimentations comme on l'entend aujourd'hui, mais plus de dissections anatomiques et d'observations [84,85].

L'expérimentation animale « moderne » se généralise à partir du XIX^{ème} siècle avec les travaux de François Magendie et Claude Bernard, notamment avec l'ouvrage *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale* écrit par ce dernier (Figure 12) [86]. Cette période est aussi celle de nombreuses avancées dans le domaine de la médecine et de la microbiologie, le recours à l'expérimentation animale se généralise et l'utilisation d'animaux devient massive.



Figure 12. Expérimentations de Claude Bernard

(D'après La Leçon de Claude Bernard, Léon Lhermitte, 1889)

Au XX^{ème} siècle, le code de Nuremberg précise les conditions auxquelles doivent satisfaire les expérimentations sur l'être humain, ainsi, « les fondements de l'expérience doivent résider dans les résultats d'expériences antérieures faites sur des animaux » (code de Nuremberg). A l'heure d'aujourd'hui, plus de 70 prix Nobel ont été décernés à des travaux réalisés sur des animaux. Dans le domaine des maladies infectieuses et de la microbiologie, on notera notamment les travaux sur la pénicilline en 1945, les mises au point vaccinales de 1951 et 1954, plus récemment les travaux sur le VIH récompensés par le prix Nobel de 2008, ou le développement d'antiparasitaires en 2015 (Annexe 1). L'expérimentation animale a évolué, prenant en compte la douleur et le bien-être animal, mais reste importante. En 2019, 1 865 403 animaux ont été utilisés à des fins scientifiques en France [87]. Les souris représentaient 61% de ces animaux, largement majoritaires devant les poissons (12%) et les rats (9%) (Figure 13).

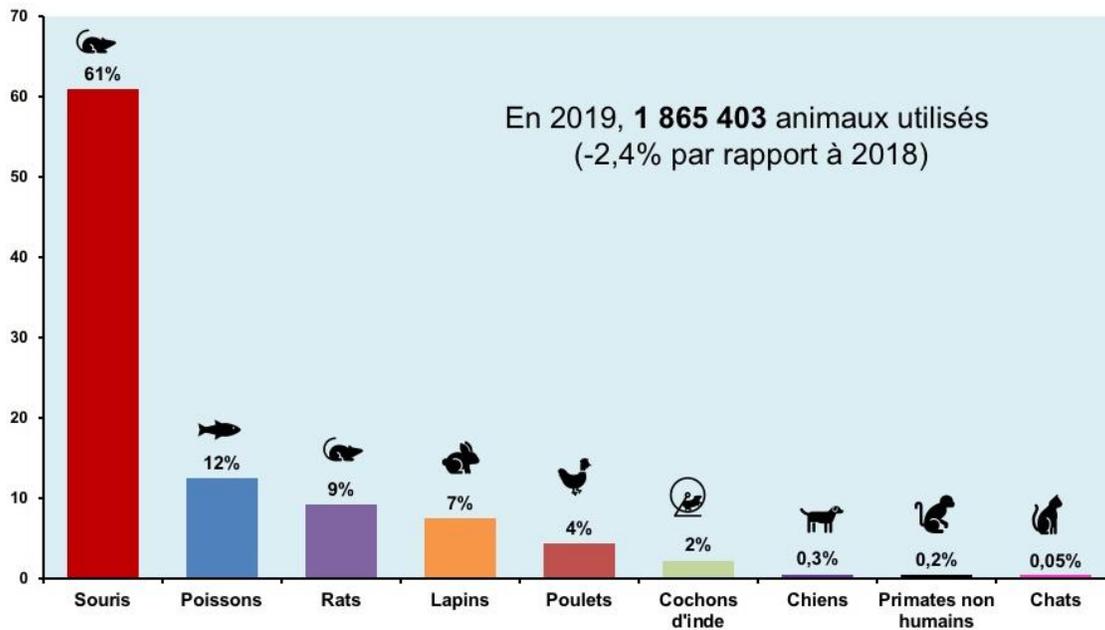


Figure 13. Répartition des animaux utilisés en expérimentation animale en France, en 2019.

L'expérimentation animale soulève, depuis les premiers travaux, des questions éthiques. Dès l'Antiquité, Pythagore ou Plutarque prônaient un respect global des animaux proches de l'Homme. Au XIX^{ème} siècle, des mouvements antivivisectionnistes voient le jour en opposition à la conception de l'animal-objet ou encore « machine vivante » décrite par Claude Bernard [88]. Ainsi, les premières réglementations visant à encadrer l'expérimentation animale sont publiées dans plusieurs pays d'Europe. La première directive européenne apparaît en 1986, réglementant la provenance des animaux, leurs conditions de vie et d'expérimentations. Depuis 2013, une directive publiée en 2010 (2010/63/UE et décret n° 2013-118), reprend les précédentes réglementations et ajoute des règles éthiques strictes encadrant l'expérimentation animale, telles que l'application du principe des « 3R ». Ce principe, initialement formulé en 1959 par des biologistes anglais, repose sur trois aspects :

- **Remplacement** : l'expérimentation animale ne doit être utilisée uniquement si aucune méthode alternative ne permet de répondre à la problématique.
- **Réduction** : le nombre d'animaux utilisés doit être calculé et réduit au minimum nécessaire.
- **Raffinement** : le bien-être animal doit être pris en compte de même que la douleur qui doit être réduite, supprimée ou soulagée.

Les projets doivent faire l'objet d'une demande d'Autorisation de Projet utilisant des Animaux à des FIns Scientifiques (APAFIS). Cette demande répond à un cahier des charges très précis et détaille les raisons justifiant le projet, le nombre d'animaux utilisés, chacune des procédures réalisées, les résultats attendus ainsi que les « points limites » permettant de limiter la douleur à son minimum (Annexe 2). Ces demandes sont examinées par un comité d'éthique et doivent être approuvées par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation avant l'initiation du projet. Cette directive concerne l'ensemble des animaux vertébrés (y compris les poissons), quel que soit leur stade de développement, utilisés à des fins scientifiques.

4.2. Avantages et inconvénients

Les mammifères sont des êtres complexes avec de nombreuses similarités anatomiques, physiologiques et génétiques décrites entre les espèces. Par exemple, en plus des similarités physiologiques, le génome de la souris est très proche du génome humain [89]. Les modèles animaux permettent ainsi d'explorer de nombreuses fonctions physiologiques telles que la régulation hormonale ou la réponse immunitaire ou au stress, ainsi que des processus physiopathologiques comme le développement des tumeurs malignes ou encore l'infection par un micro-organisme donné [90–94]. Ces différents aspects nécessitent d'étudier un organisme dans son ensemble, ce qui, à l'heure actuelle, n'est pas réalisable sur des modèles *in vitro*. En effet, bien que ces modèles deviennent de plus en plus performants, ils ne permettent pas encore de reproduire un organisme et ses multiples réponses dans son ensemble. Les hypothèses qui en

sont déduites nécessitent ainsi d'être validées *in vivo* [95]. De plus, dans certains domaines de la recherche comme la recherche pharmaceutique visant à développer de nouveaux médicaments, l'expérimentation animale est indispensable avant les essais sur l'être humain. On pourra également noter qu'en raison de la grande proximité génomique existant entre la souris et l'homme, il est possible de remplacer des gènes murins par des gènes humains et d'aboutir à des lignées « humanisées ». Cette technique est notamment utilisée dans la production de certains anticorps monoclonaux [96]. D'un point de vue strictement scientifique, les modèles animaux permettent de réaliser des expériences avec une puissance statistique importante et d'obtenir des résultats statistiquement plus fiables [97]. En effet, les animaux utilisés pour la recherche sont élevés dans des conditions standardisées réduisant ainsi les facteurs environnementaux responsables des variations interindividuelles. De plus, il est possible d'étudier un effectif important, d'autant plus avec l'utilisation d'animaux invertébrés, standardisés et contrôlés tels que *Galleria mellonella*.

Néanmoins, cette homogénéité des animaux étudiés peut représenter un inconvénient. Les réponses à une situation spécifique sont, chez l'homme, très variables d'un individu à un autre. L'utilisation d'animaux standardisés, par exemple d'une seule lignée de souris, ne pourra refléter cette variabilité interindividuelle. A cela s'ajoute la capacité des résultats à être transposables d'un organisme à un autre. En effet, malgré de nombreuses similitudes, les observations faites sur un animal ne sont pas systématiquement confirmées chez l'être humain. Ceci peut en partie être expliqué par les différences génétiques. Malgré de grandes similitudes, des variations d'expression et de régulation des gènes peut conduire à des réponses physiologiques ou immunologiques différentes [95]. De plus, des variations peuvent être observées au sein d'une même espèce. Cela a notamment été décrit avec le virus Ebola inoculé à différentes lignées de souris. Certaines lignées infectées ne présentaient aucun symptôme, d'autres décédaient précocement sans symptôme préalable, enfin certaines présentaient un

tableau de fièvre hémorragique comparable à la présentation clinique de la maladie chez l'humain [93]. Sélectionner un animal, voire une espèce ou une lignée précise, présentant des similitudes avec l'être humain vis-à-vis de la question étudiée est donc très important pour l'interprétation et la transposabilité des résultats. Ainsi, certaines lignées de souris seront préférentiellement utilisées dans la recherche en infectiologie alors qu'elles ne permettront pas de répondre à des problématiques cancéreuses ou métaboliques. Alors que les animaux de petite taille sont largement utilisés dans les études concernant l'aspect physiopathologique ou thérapeutique d'une maladie, des animaux de grande taille sont utilisés pour mettre au point certaines techniques chirurgicales. Par exemple, le porc est un modèle très employé dans le domaine de la chirurgie cardiaque [98,99].

4.3. Les modèles d'étude d'*Enterococcus* spp

Les premiers modèles dans l'étude des entérocoques sont apparus en 1899 avec les travaux de MacCallum et Hastings au cours desquels des souris et des lapins ont été infectés avec une souche d'entérocoque [2]. Les souris et lapins sont les animaux vertébrés les plus fréquemment utilisés dans l'étude de la pathogénèse des entérocoques mais de nombreux modèles, notamment sur des animaux invertébrés tels que *Galleria mellonella*, *Caenorhabditis elegans* ou encore *Drosophila melanogaster* ont été récemment mis au point [100,101]. Ces derniers présentent l'avantage d'être petits, simples à héberger et à manipuler et représentent un coût moindre par rapport aux animaux vertébrés. Les modèles sur animaux invertébrés sont ainsi largement utilisés dans les premières phases des études sur les facteurs de virulence ou le développement de nouvelles molécules nécessitant de très grands effectifs [102,103]. En revanche, des modèles sur des animaux vertébrés sont nécessaires pour étudier les effets des entérocoques sur les organes et dans un contexte de réponse immunitaire innée ou acquise [19]. De nombreux modèles expérimentaux ont été développés, et le choix de l'animal va dépendre de la problématique étudiée. Récemment, plusieurs synthèses des modèles d'étude des

entérocoques ont été publiées (Figure 14) [19,100]. Seuls les modèles utilisés dans ce travail seront détaillés.

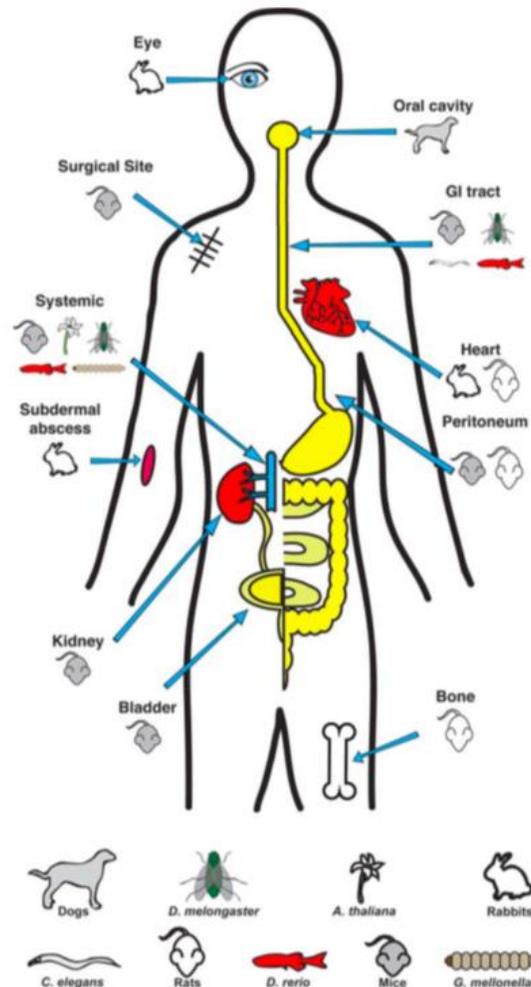


Figure 14. Modèles animaux mis au point pour l'étude des entérocoques, en fonction de la pathologie étudiée.

(Goh *et al.*, 2017) [19]

4.3.1. Colonisation intestinale

Alors que les études nécessitant une procédure chirurgicale sont préférentiellement réalisées sur des rats ou des lapins en raison de leur plus grande taille, la majorité des modèles de colonisation intestinale est réalisée sur la souris [19]. En effet, ce petit animal est peu coûteux

et facilement manipulable. Les souris étant généralement hébergées par cage de cinq, des études sur un nombre important d'individus sont possibles « logistiquement » (par opposition notamment au lapin, plus gros et hébergé en cage unique). De plus, l'avantage majeur de la souris dans l'étude de la colonisation du tube digestif est qu'elle partage avec l'être humain un développement intestinal ainsi qu'une réponse immunitaire similaires [89]. Enfin, les flores intestinales humaine et murine ont en commun leur diversité [104]. Ce dernier point est à nuancer, une étude ayant récemment démontré que les souris de laboratoire, élevées dans des conditions confinées, avaient un microbiote moins diversifié que les souris élevées dans un milieu naturel [105]. Cet élément peut ainsi avoir des conséquences sur les résultats des études utilisant le microbiote naturel de la souris. La coprophagie murine naturelle peut également être à l'origine de biais de résultats et doit être prise en considération lors de la mise en place des projets. Les entérocoques étant ubiquitaires mais fréquemment isolés du tube digestif des mammifères, de nombreuses études ont mis en place un modèle de colonisation intestinale pour explorer la pathogénèse des entérocoques [100]. Ces protocoles se déroulent généralement en deux étapes. Dans un premier temps, des antibiotiques sont administrés par voie orale ou sous-cutanée pour fortement réduire la flore existante et permettre aux souches d'entérocoques étudiées de s'implanter. Dans un second temps, une suspension bactérienne calibrée est inoculée aux souris par voie orale, à l'aide d'une sonde de gavage ou additionnée à l'eau de boisson [106]. Il est également possible d'utiliser des souris « *germ free* », sans microbiote, mais ces lignées sont coûteuses et par conséquent moins utilisées.

Une revue de la littérature sur les modèles utilisant une colonisation intestinale murine à entérocoques et publiée entre les années 2000 et 2017 a été réalisée. Les différents protocoles utilisés variaient sur la lignée de souris, les molécules utilisées, le mode d'administration de la suspension d'entérocoques et la durée du protocole. Les souris les plus fréquemment utilisées étaient des souris femelles, CF1, C57bl/6 ou Balb/c, âgées de 6 à 8 semaines ce qui correspond

à de jeunes adultes dont le développement intestinal est terminé. Les souris appartenant aux lignées Balb/c et C57bl/6 sont consanguines contrairement aux souris CF1. Plusieurs antibiotiques étaient utilisés, appartenant principalement à la famille des β -lactamines, le choix des molécules étant très variable selon les équipes. Plusieurs d'entre elles utilisaient une association ceftriaxone – céfoxitine, la ceftriaxone étant administrée par voie sous-cutanée (SC) (100 μ L, 12 mg/ml) toutes les 12 heures, les deux jours précédant l'inoculation. La céfoxitine était ensuite ajoutée à l'eau de boisson (0,125 mg/mL) durant toute la durée du protocole [107–110]. Une combinaison de gentamicine et de clindamycine a, quant à elle, été utilisée dans une récente étude ayant pour objectif d'évaluer la colonisation intestinale par des souches d'*E. faecium* appartenant aux différents clades. La gentamicine était additionnée à l'eau de boisson (1 mg/mL) pendant deux jours et la clindamycine était injectée par voie SC pendant deux jours avant l'inoculation [111]. Heikens *et al.* utilisaient quant à eux la ceftriaxone, une dose de 2,4 mg/jour était injectée par voie SC tout au long de l'expérimentation [112]. Enfin, on peut noter que quelques équipes administraient uniquement de l'ampicilline *via* l'eau de boisson (0,5 mg/mL) [113,114].

Aux vues de l'hétérogénéité des protocoles utilisés pour induire une colonisation intestinale, il semblait intéressant de comparer les résultats obtenus avec plusieurs d'entre eux.

4.3.2. Endocardite infectieuse (EI)

L'EI est une pathologie caractérisée par l'infection affectant les parois internes des cavités du cœur (endocarde) et plus spécifiquement les valves cardiaques. La physiopathologie de cette infection est complexe. Une altération d'une valve cardiaque entraîne la formation d'une lésion élémentaire composée de dépôts fibrino-plaquettaires stériles. Secondairement à une bactériémie, les bactéries adhèrent et se multiplient au niveau de ces lésions, entraînant le développement de lésions à la fois prolifératives et destructrices (Figure 15) [115,116]. Ces lésions peuvent être à l'origine de foyers secondaires et de lésions inflammatoires.

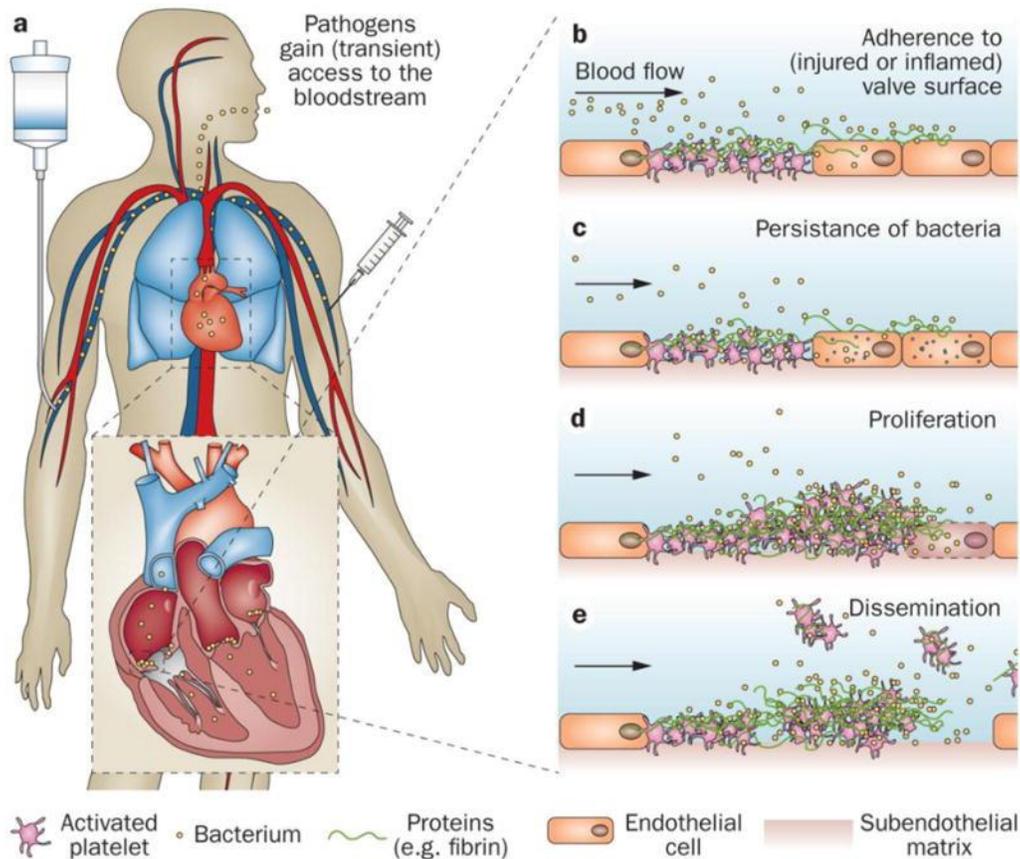


Figure 15. Représentation simplifiée de la physiopathologie de l'EI. (Holland *et al.*, 2016) [117]

(a) Bactériémie (b et c) adhésion à une valve cardiaque altérée (d) prolifération bactérienne et formation d'une végétation (e) dissémination sous forme d'emboles

Le modèle animal présente l'avantage de pouvoir induire artificiellement une EI avec une physiopathologie similaire à celle observée chez l'être humain et ainsi améliorer les connaissances à propos de cette pathologie. Les premiers modèles d'EI sont apparus en 1923 sur des chiens et consistaient à induire des lésions de l'endocarde par des techniques chirurgicales très invasives puis à administrer une suspension bactérienne. Ce modèle, laborieux à mettre en place, a été par la suite peu utilisé [118,119]. En 1970, Garrison et Freedman ont été les premiers à induire une EI par mise en place d'un cathéter intracardiaque contaminé à *S. aureus* chez des lapins [120]. Cette technique a par la suite été adaptée par Durack et Beeson, en utilisant un cathéter stérile puis en injectant une suspension bactérienne par voie intra-veineuse (IV) [115].

Ce modèle reste à l'heure actuelle le modèle de référence d'EI. Quelques années plus tard ce protocole a été adapté chez le rat pour des raisons logistiques et économiques [121,122]. La procédure consiste à insérer, sous anesthésie générale, un cathéter dans le ventricule *via* la carotide droite afin de déstabiliser l'endocarde. Le cathéter est laissé en place et infecté 24 heures après sa mise en place, en induisant une bactériémie par l'injection IV d'une suspension bactérienne calibrée. Un inoculum important est nécessaire pour provoquer une EI et observer des végétations (Figure 16) [118].

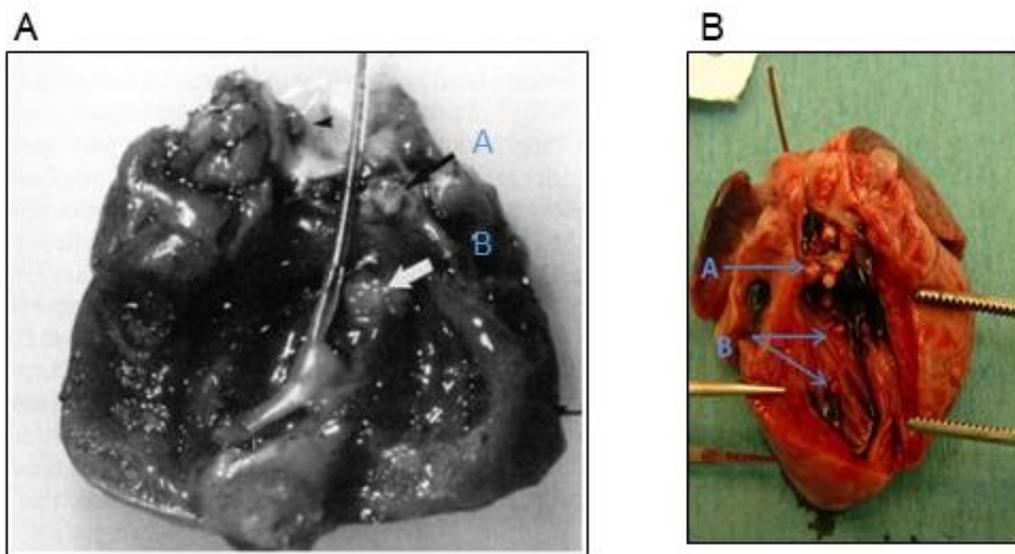


Figure 16. Végétations obtenues expérimentalement par induction d'une bactériémie secondairement à la pose d'un cathéter intracardiaque chez le rat (A) et le lapin (B).

Végétations au niveau de la valve cardiaque (flèche A) et de la paroi ventriculaire (flèche B).

Photo A : Baddour *et al.*, 1989 [118] ; Photo B : photo personnelle

Les deux principales indications du modèle *in vivo* d'EI sont l'étude des facteurs de virulence et les essais thérapeutiques. Les études publiées sur les modèles d'EI à *E. faecalis* sont plus fréquemment réalisées sur des lapins et sur des rats pour l'étude d'*E. faecium* [19]. Cette différence tient probablement aux habitudes techniques des équipes et aux agréments des animaleries associées, chaque animal nécessitant des agréments spécifiques. Les entérocoques

étant la 3^{ème} cause d'EI, ce modèle est largement utilisé dans l'étude de la pathogénèse des entérocoques [19].

4.3.3. Translocation bactérienne intestinale (TBI)

La translocation bactérienne intestinale se définit par le passage de bactéries viables d'origine digestive à travers l'épithélium intestinal vers les ganglions mésentériques pouvant entraîner une dissémination lymphohématogène [123]. Ce processus a été mis en évidence en 1979 par Berg et Garlington à l'aide d'un modèle expérimental réalisé sur la souris [124]. Les mécanismes aboutissant à ce phénomène sont complexes et certains demeurent inexplicables. Trois facteurs, généralement associés, ont été démontrés comme étant impliqués dans la physiopathologie de la TBI : l'altération de la muqueuse intestinale, le déséquilibre de la flore digestive et les anomalies de défenses immunitaires [123]. De nombreux contextes cliniques pouvant être à l'origine d'un ou plusieurs de ces facteurs peuvent ainsi aboutir à une TBI. Ceux-ci sont aussi variés que nombreux. On citera notamment la prise d'antibiotiques ou de chimiothérapies anticancéreuses, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), les pathologies hépatiques telles que la cirrhose ou encore les états de choc septique ou hémorragique [125–128]. Chaque contexte clinique peut ainsi faire l'objet d'un modèle expérimental spécifique. L'induction d'une neutropénie par administration de cyclophosphamide (CTX) chez des souris préalablement colonisées par la bactérie étudiée est l'un des modèles décrits pour observer un tableau d'infection systémique secondaire à une TBI [129–132]. L'induction de la neutropénie est réalisée par injection de CTX par voie intra-péritonéale (IP). Les doses administrées varient de 250 mg/kg à 450 mg/kg selon les études, de même que la fréquence des injections TBI [129–133]. Dans l'étude des bactériémies à VRE secondaires à une TBI, l'administration d'antibiotiques en parallèle du CTX augmente la prévalence des infections systémiques [134].

Plusieurs études ont montré que la colonisation intestinale à *E. faecium*, et plus particulièrement à EfRV, était augmentée chez les patients hospitalisés dans les services d'oncologie et d'oncohématologie, la durée de l'hospitalisation étant généralement prolongée dans ces services [135,136]. En effet, les thérapeutiques anti-cancéreuses peuvent entraîner un déséquilibre de la flore intestinale et avoir un impact sur la barrière intestinale, augmentant le risque de TBI. De plus, ces molécules peuvent également induire des altérations profondes de l'immunité cellulaire, favorisant la survenue de complications infectieuses [137]. L'administration d'antibiotiques est fréquente chez ces patients, à visée prophylactique ou thérapeutique, et augmente également le risque de colonisation à EfRV et de TBI. Ces patients ont ainsi un risque élevé de présenter un épisode de bactériémie à EfRV à point de départ digestif, auquel s'associe une augmentation du risque de mortalité [138]. Le modèle murin de TBI repose sur la colonisation intestinale à EfRV induite par l'administration d'antibiotiques chez des souris rendues neutropéniques par administration de CTX. Il semble reproduire assez fidèlement la physiopathologie humaine des infections systémiques secondaires à une TBI et est ainsi adapté dans l'exploration des mécanismes conduisant à la survenue des bactériémies à EfRV.

PROJET DE RECHERCHE

L'objectif de ce travail était d'évaluer *in vivo* le rôle des sARN dans la pathogénie d'*E. faecium* à partir de modèles de colonisation et d'infection. Le projet de recherche s'est articulé autour de deux axes principaux et deux axes secondaires :

- La mise au point de modèles expérimentaux de colonisation et d'infection adaptés aux objectifs de ce travail. Le laboratoire étant plus spécialisé dans l'étude de *S. aureus*, de nouveaux modèles expérimentaux adaptés aux entérocoques ont dû être développés. Il a tout d'abord été choisi d'étudier les sARN dans un modèle de colonisation intestinale, celle-ci étant le point de départ des épidémies hospitalières. De nombreux protocoles *in vivo* sont décrits dans la littérature, plusieurs ont été sélectionnés et comparés afin de créer un protocole optimisé pour les objectifs de notre étude. Afin d'étudier les sARN dans l'infection, il a tout d'abord été choisi de développer un modèle d'endocardite infectieuse. En effet, les entérocoques sont les 3^{ème} micro-organismes responsables d'endocardite après les staphylocoques et les streptocoques. De plus, ce modèle est largement décrit dans la littérature depuis de nombreuses années. De nombreuses difficultés ont été rencontrées lors de la mise en place de ce modèle conduisant à son abandon. Il a donc été décidé de développer un modèle de translocation intestinale afin d'induire une infection systémique.
- L'étude *in vitro* et *in vivo* du sARN_0160 (*ern0160*). Quatre souches ont été étudiées, seules et en compétition. La souche sauvage, la souche sauvage délétée de l'*ern0160*, la souche délétée de l'*ern0160* portant le plasmide vide pAT29 et la souche délétée de l'*ern0160* et *trans*-complémentée avec l'*ern0160*. La construction de ces souches a fait l'objet d'un travail précédent réalisé par le Dr Killian Le Neindre.

- La poursuite du travail de caractérisation des ARN décrits chez *E. faecium*. Plusieurs sARN exprimés dans plusieurs souches appartenant au clade A1 et donc potentiellement impliqués dans l'adaptation à l'environnement hospitalier ont été sélectionnés. Leur expression a été évaluée par technique de Northern-Blot ou RT-qPCR et leurs extrémités déterminées par 5'3' RACE mapping.

- La mise en application du modèle de colonisation dans un autre protocole. Le modèle de colonisation obtenu au début de ce travail a été utilisé pour tester la capacité de décolonisation d'une molécule.

MISE AU POINT DES MODELES ANIMAUX

Les ARN régulateurs des entérocoques ne sont étudiés dans l'unité que depuis récemment et aucun modèle expérimental *in vivo* adapté spécifiquement à cette thématique n'a été jusque-là mis en place. Une étape de mise au point a donc été nécessaire avant leur étude.

Tous les protocoles présentés dans ce travail ont été validés par un comité d'éthique et ont fait l'objet d'une autorisation accordée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation.

La souche d'*E. faecium* Aus0004, isolat clinique d'EfRV porteur de l'opéron *vanB* et appartenant au CC17, a été utilisée dans tous les protocoles de mise au point [139]. Les suspensions ont été calibrées pour obtenir un inoculum compris entre 10^8 et 10^9 unités formant colonies (UFC) /mL.

1. Colonisation intestinale

Les protocoles expérimentaux de colonisation décrits dans la littérature ont été majoritairement réalisés chez la souris. Tous les protocoles expérimentaux de colonisation intestinale avaient en commun une première étape de « décolonisation », obtenue par l'administration d'antibiotiques afin de réduire la flore intestinale normale de l'animal et ainsi permettre la colonisation par la ou les bactérie(s) classiquement administrée(s) par voie orale (gavage) ou dans l'eau de boisson (Figure 17).

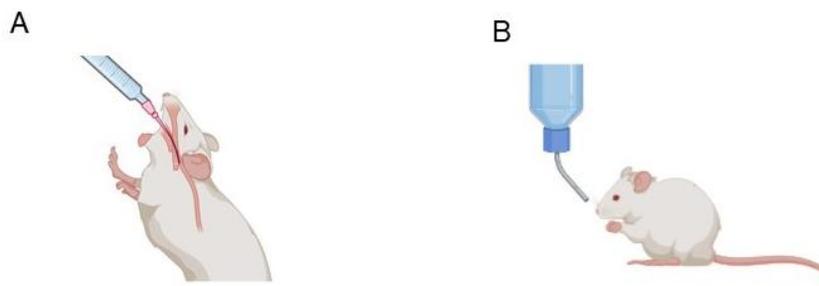


Figure 17. Mode d'administration oral chez la souris.
(A) Gavage (B) *via* l'eau de boisson.

La revue de la littérature a permis d'observer une très grande diversité dans les protocoles antibiotiques administrés. Nous avons ici choisi de comparer les résultats obtenus avec trois associations d'antibiotiques publiées par différentes équipes. Les résultats obtenus avec ces trois protocoles ont permis de les adapter aux objectifs du travail et de tester ainsi deux nouveaux protocoles. La colonisation intestinale était évaluée par la quantité d'*E. faecium* retrouvés dans les fèces des souris. Afin de compléter les données, nous avons également quantifié les entérocoques présents dans les différentes sections de l'intestin (intestin grêle, caecum et colon).

1.1. Animaux

Des souris femelles Swiss âgées de 6 semaines, non consanguines, au statut « SPF » (*Specific Pathogen Free* : indemnes des principaux pathogènes liés à l'espèce) ont été utilisées. Elles étaient hébergées par cage de cinq, dans une pièce à température et luminosité contrôlées (cycle jour-nuit de 12h), et recevaient eau et nourriture stérilisées *ad libitum*. Les souris étaient acclimatées à l'animalerie pendant une semaine et chaque animal était identifié par un numéro unique.

1.2. Prérequis

Il était important de déterminer au préalable, la composition de la flore des souris utilisées dans toutes les expérimentations de colonisation. L'étude de la flore anaérobie n'étant pas réalisable au laboratoire, seule la flore aérobie a été décrite. L'étude a été faite sur trois cages de cinq souris. Dix boulettes de matière fécale (BMF) par cage, obtenues par massage abdominal léger, ont été mises en suspension dans 3 mL de NaCl 0,9%. Cette suspension a été diluée en série et mise en culture sur des géloses non sélectives (géloses au sang, Trypticase-soja (TS) et *Brain-heart infusion* (BHI)), en aérobie à 35 +/- 2°C pendant 24 heures. Les différentes colonies ont ensuite été dénombrées et identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Microflex, Bruker Daltonics). Les résultats étaient comparables pour les trois cages, retrouvant une majorité

de lactobacilles ($\approx 85\%$) et dans une moindre mesure, *E. coli* ($\approx 8\%$) et *E. faecalis* ($\approx 6\%$) (Figure 18).

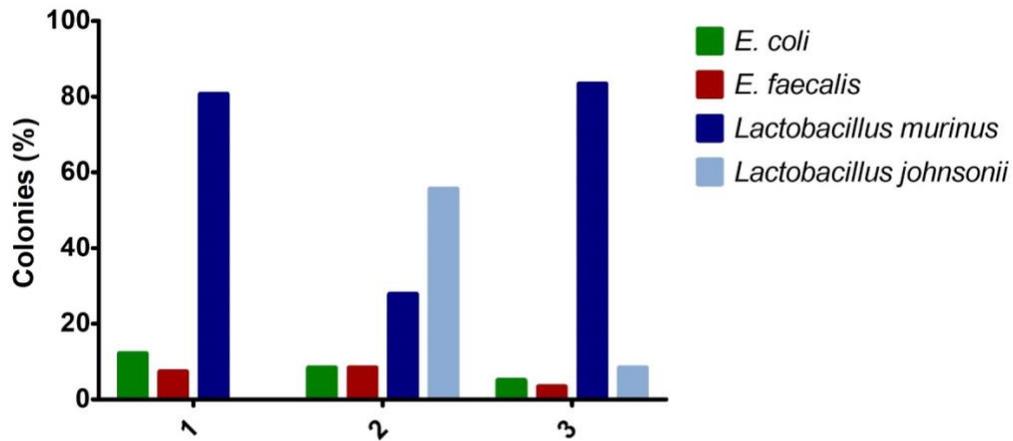


Figure 18. Composition de la flore intestinale des souris Swiss.

Dans la littérature, deux méthodes sont habituellement décrites pour administrer une suspension bactérienne par voie orale. La première consiste à utiliser une sonde de gavage. Bien que très largement utilisée, aucun protocole réellement standardisé n'est disponible pour cette technique et une grande variabilité des modalités de réalisation est observée entre les équipes [140]. Cette méthode présente l'avantage de contrôler précisément la quantité prise par chaque souris. En revanche, c'est un geste technique invasif générant un stress pour l'animal et pouvant occasionner des dommages au niveau de l'œsophage s'il est mal réalisé. La seconde méthode est l'addition dans l'eau de boisson. Cette technique, non invasive, ne génère aucun stress pour l'animal. Cependant, il est impossible de contrôler la quantité prise par chaque souris, celles-ci étant hébergées par cages de cinq. En 2020, Scarborough *et al.* ont décrit une nouvelle technique moins traumatique, utilisant une micropipette pour administrer oralement de la rispéridone (Figure

19) [141]. Pour ce travail, dans une démarche d'amélioration du bien-être animal, nous avons choisi d'adapter cette technique afin d'administrer un inoculum précis sans méthode invasive.

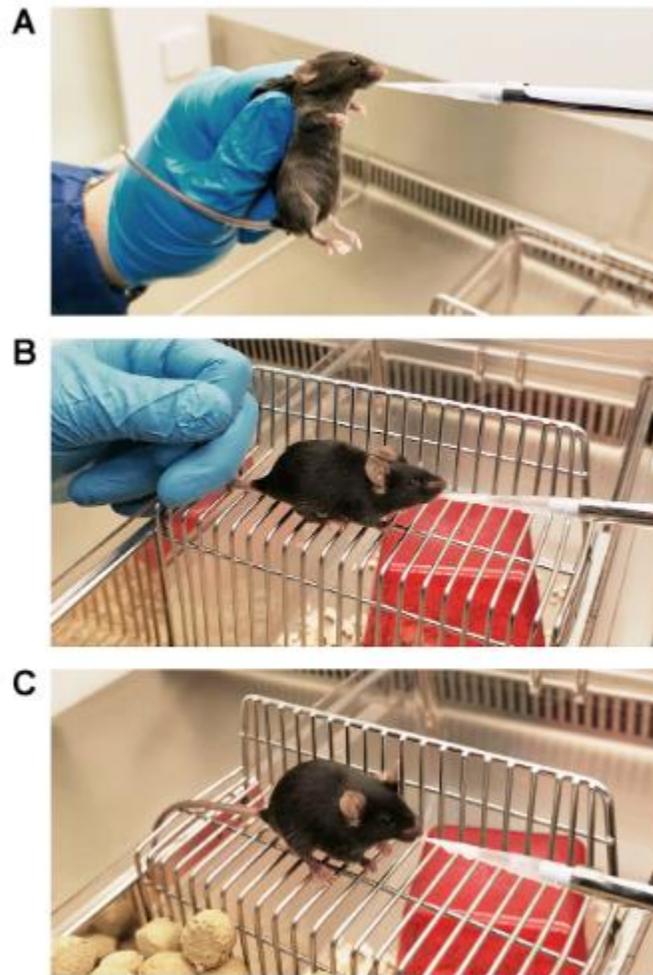


Figure 19. Administration orale, non invasive, d'un volume contrôlé

(Scarborough *et al.*, 2020) [141].

Le premier jour, les souris sont contentionnées pour l'administration (A).

Les jours suivants, la contention n'est plus nécessaire (B) et (C).

Pendant plusieurs jours avant la colonisation, une suspension d'eau stérile additionnée de pâte à tartiner a été donnée aux souris à l'aide d'une seringue, plusieurs fois par jour afin de les habituer. Après quelques jours, les souris prenaient la suspension d'elles-mêmes ou légèrement contentionnées. Ainsi pour la colonisation, une petite quantité de pâte à tartiner était ajoutée à la

suspension bactérienne permettant ainsi d'éviter l'utilisation d'une sonde de gavage. La quantité de bactéries isolées à J3 dans les fèces des souris n'étant pas significativement différente au sein d'un groupe ayant reçu la même suspension, nous avons validé cette technique pour la suite des travaux. L'absence d'impact de la pâte à tartiner sur l'inoculum a été vérifié en dénombrant une suspension additionnée ou non de pâte à tartiner.

1.3. Déroulement du protocole

Le plan expérimental est représenté sur la Figure 20. Les animaux étaient tout d'abord « décolonisés » *via* l'administration d'antibiotiques selon les modalités propres à chaque protocole. A J0, une BMF était prélevée afin de s'assurer de l'absence d'entérocoques au niveau du tractus gastro-intestinal, et 200 µL d'une suspension calibrée d'*E. faecium* était administrée par voie orale à chaque souris. La litière était changée afin de diminuer l'impact de la coprophagie murine naturelle. Une BMF était ensuite obtenue pour chaque souris, par massage abdominal à J3, J5, J7, J10 et J14. A J14, les animaux étaient euthanasiés par inhalation de CO₂, puis les intestins et le caecum étaient prélevés. Chaque BMF était ensuite pesée et mise en suspension dans 1 mL de NaCl 0,9 %. Les prélèvements tissulaires étaient vidés de leur contenu manuellement, puis broyés mécaniquement (broyage à billes, FastPrep-24™, Thermo Fisher Scientific) et mis en suspension dans 1 mL de NaCl 0,9 %. Des dilutions en séries étaient ensuite réalisées pour chaque suspension et mises culture sur gélose TS et Bile-Esculine-Azide (BEA) afin de quantifier la flore aérobie et les entérocoques (*E. faecium* et *E. faecalis*), respectivement.

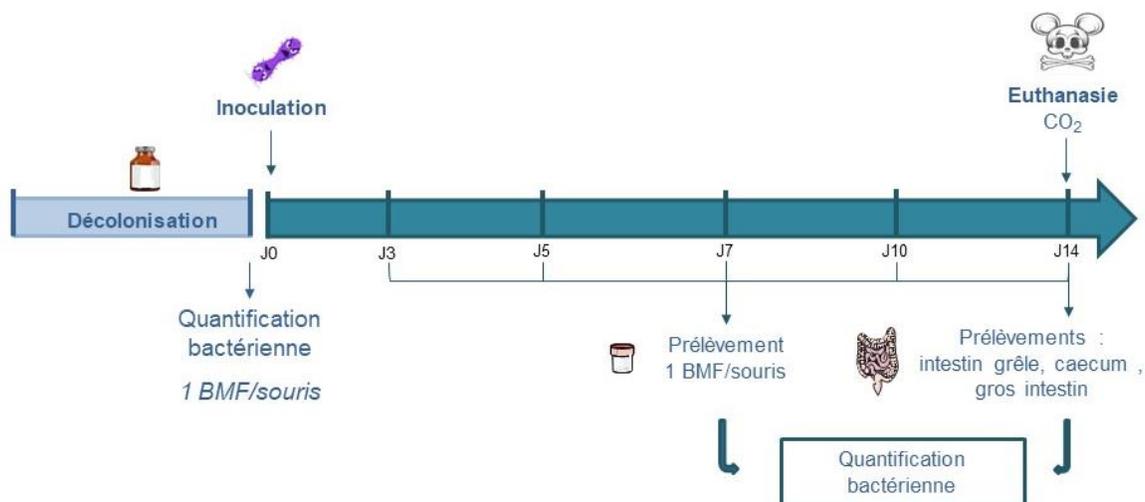


Figure 20. Protocole de colonisation intestinale.
 BMF : boulette de matières fécales

1.4. Protocoles antibiotiques

Cinq associations d'antibiotiques ont été évaluées (Figure 21) :

- **Protocole A** (Montealegre *et al.*, 2016) [142] : clindamycine + gentamicine

La clindamycine était administrée par voie SC, toutes les 12 heures pendant 4 jours (2,4 mg/jour/souris) avant la colonisation. La gentamicine était administrée *via* l'eau de boisson à une concentration de 1 mg/mL, les 2 jours précédant la colonisation.

- **Protocole B** (Zhang *et al.*, 2013) [110] : ceftriaxone + céfoxitine

La ceftriaxone était administrée par voie SC, 2 fois par jour pendant 2 jours (2,4 mg/jour/souris) avant la colonisation. La céfoxitine était ajoutée à l'eau de boisson à une concentration de 0,2 mg/mL après la colonisation et pour toute la durée du protocole.

- **Protocole C** (adapté de Heikens *et al.*, 2009) [112] : ceftriaxone seule

Dans leurs travaux, les auteurs administraient la ceftriaxone par voie SC 2 fois par jour (2,4 mg/jour/souris), 2 jours avant la colonisation et pendant les 10 jours du protocole. Pour notre

étude, la ceftriaxone a été injectée par voie SC pendant 2 jours. Après la colonisation, l'antibiotique a été additionné à l'eau de boisson à une concentration de 0,1 mg/mL.

Lors des essais avec ces trois premiers protocoles nous avons observé la présence d'*E. faecalis* en quantité plus ou moins importante selon les antibiotiques utilisés (résultat détaillé dans la partie suivante). Afin de limiter cette colonisation non souhaitée à *E. faecalis*, nous avons décidé d'ajouter de l'amoxicilline dans les protocoles suivants.

➤ **Protocole D** : ceftriaxone + céfoxitine + amoxicilline

Les céphalosporines ont été administrées selon les mêmes modalités que le protocole B. L'amoxicilline était ajoutée à l'eau de boisson pendant 2 jours avant la colonisation, à une concentration de 0,1 mg/mL.

➤ **Protocole E** : ceftriaxone + amoxicilline

De façon identique au protocole C, la ceftriaxone était administrée par voie SC puis ajoutée à l'eau de boisson. L'amoxicilline était ajoutée à l'eau de boisson, à une concentration de 0,1 mg/mL avant la colonisation puis 0,03 mg/mL durant toute la durée de la colonisation.

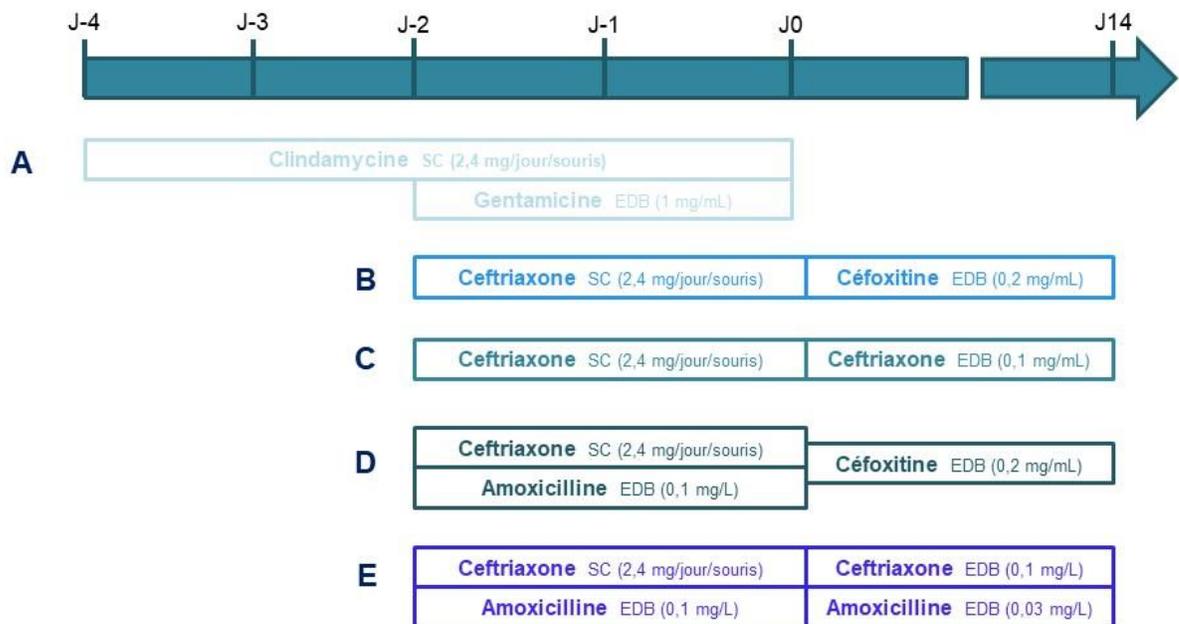


Figure 21. Modalités d'administration des différentes combinaisons d'antibiotiques.
 EDB : eau de boisson, SC : sous-cutanée

Les biberons d'eau contenant des antibiotiques étaient changés tous les jours pour garantir la concentration voulue selon la stabilité des molécules [143,144]. Chaque protocole a été évalué sur cinq souris. Un groupe de cinq souris a également été colonisé sans antibiothérapie préalable afin de constituer un groupe témoin.

1.5. Analyse statistique

Les résultats étaient exprimés en UFC par gramme de fèces. L'analyse statistique de la comparaison des protocoles antibiotiques a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis. Les charges bactériennes isolées dans les différents segments de l'intestin ont été analysés avec un test non paramétrique de Mann-Whitney. Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme

statistiquement significative. Ces tests ont été réalisés avec le logiciel GraphPad 7 (GraphPad Software, Inc.).

1.6. Résultats

Les résultats sont représentés sur la Figure 22. Un inoculum moyen de 1×10^9 UFC/mL était administré. Dans le groupe témoin, ayant reçu la suspension d'*E. faecium* sans antibiothérapie préalable, aucune souris n'a été colonisée, confirmant la nécessité de « décoloniser » les animaux pour obtenir une colonisation avec le micro-organisme étudié. Avec le protocole A (clindamycine/gentamicine), une colonisation importante était obtenue à J3 ($3,34 \times 10^9$ UFC/g). A partir de J5, la quantité d'*E. faecium* diminuait progressivement et devenait nulle à partir de J10. Alors qu'aucune colonie d'*E. faecalis* n'était isolée avant la colonisation et jusqu'à J5, une quantité progressivement croissante était observée à partir de J7. A J14, la quantité d'*E. faecalis* atteignait $3,08 \times 10^4$ UFC/g. Les quatre autres protocoles, utilisant des céphalosporines plus ou moins associées à de l'amoxicilline, permettaient d'obtenir une colonisation importante à partir de J3 et stable jusqu'à J14. Avec les protocoles B (ceftriaxone/céfoxitine) et C (ceftriaxone), une quantité moyenne d'*E. faecium* de $8,86 \times 10^9$ UFC/g et $5,50 \times 10^9$ UFC/g respectivement était retrouvée. A noter qu'à la fin du protocole, des colonies d'*E. faecalis* étaient isolées dans la quasi-totalité des prélèvements. Elles restaient néanmoins minoritaires par rapport à *E. faecium*. La quantité moyenne d'*E. faecium* isolée dans les BMF des souris ayant reçu les protocoles D (ceftriaxone/céfoxitine/amoxicilline) et E (ceftriaxone/amoxicilline) était de $8,89 \times 10^9$ UFC/g et $6,69 \times 10^9$ UFC/g, respectivement. Contrairement aux deux protocoles précédents, aucune colonie d'*E. faecalis* n'était retrouvée. D'un point de vue statistique, aucune différence significative n'était observée entre les quantités d'*E. faecium* obtenues avec les protocoles B, C, D et E ($p = 0,6$). La colonisation intestinale étant importante et stable à partir de J3, la durée du protocole a été raccourcie à dix jours pour la suite des travaux.

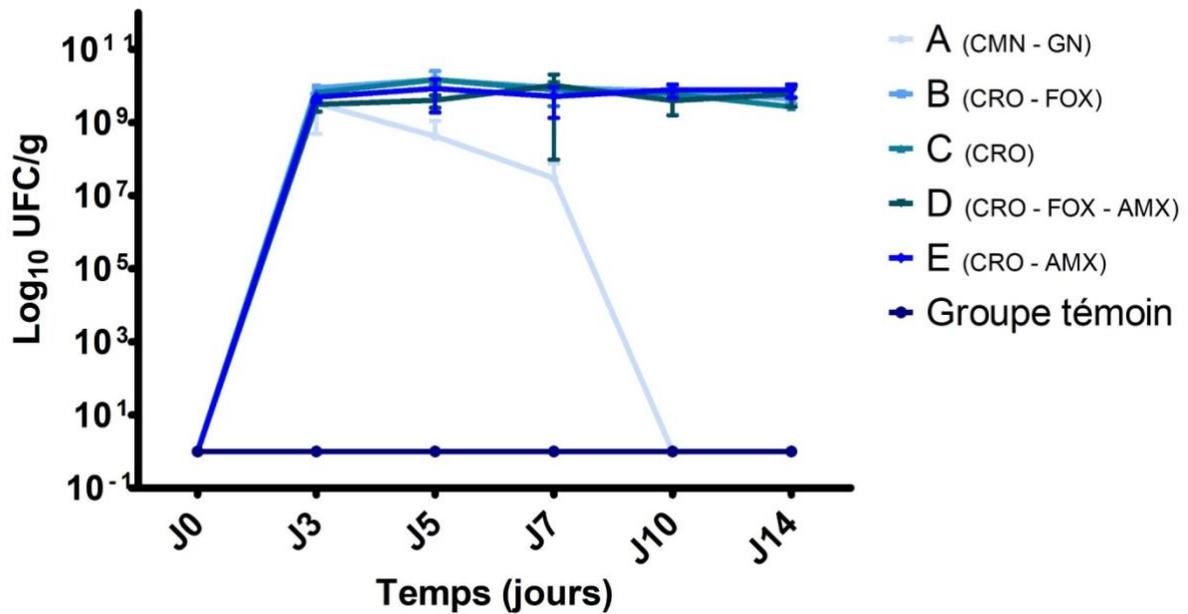


Figure 22. Charge bactérienne moyenne des BMF en fonction du protocole antibiotique.
 AMX : amoxicilline, CMN : clindamycine, CRO : ceftriaxone, FOX : céfoxitine, GN : gentamicine.

Ces résultats ont été intégrés à l'article présentant les résultats de l'étude de l'Ern0160.

Dans un second temps, nous avons quantifié *E. faecium* dans les différents tissus intestinaux : intestin grêle, caecum et gros intestin (Figure 23).

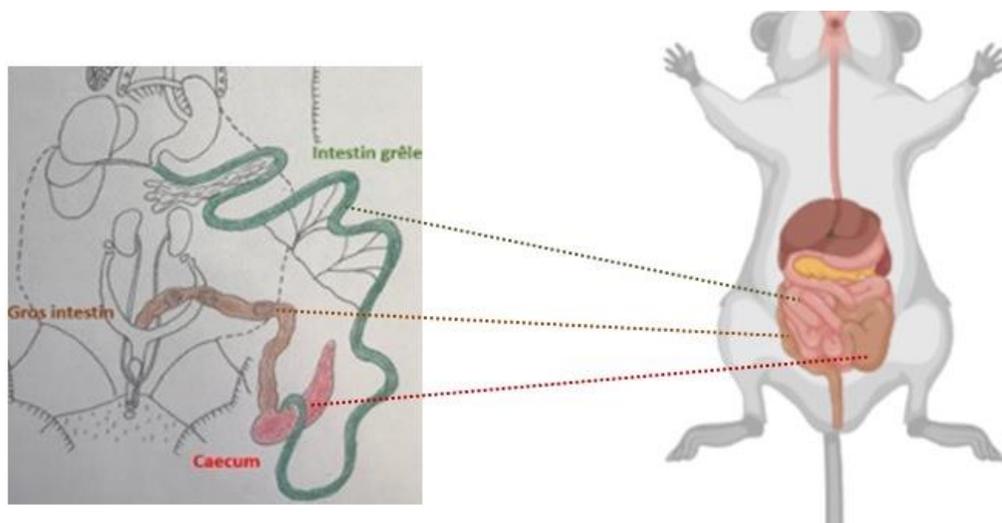


Figure 23. Anatomie du système digestif murin.

Cette analyse a été réalisée sur les souris ayant reçu les protocoles B et C ($n = 10$). Des résultats similaires étaient obtenus quels que soient les antibiotiques utilisés pour la décolonisation. Un inoculum plus important était retrouvé dans le caecum avec en moyenne $2,1 \times 10^9$ UFC/g d'*E. faecium* ($p < 0,05$). L'intestin grêle et le gros intestin contenaient en moyenne $4,2 \times 10^7$ et $9,1 \times 10^8$ UFC/g, respectivement (Figure 24).

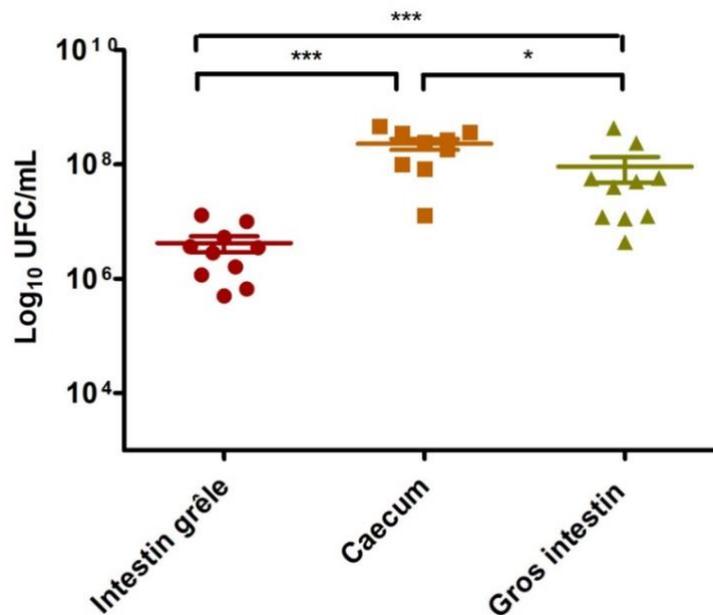


Figure 24. Charge bactérienne dénombrée dans les différents segments de l'intestin.

1.7. Discussion

En l'absence de modèles adaptés à l'étude des entérocoques mis en place au laboratoire, le développement de nouveaux protocoles adaptés aux objectifs de ce travail était une étape indispensable à l'étude du rôle des sARN *in vivo*. Les entérocoques étant essentiellement retrouvés dans la flore intestinale, le premier modèle développé était un modèle de colonisation intestinale afin d'observer le rôle potentiel des sARN dans ce processus. Ce modèle a été mis en place chez la souris, animal vertébré le plus fréquemment utilisé dans l'étude des entérocoques

au sein du système digestif [19]. Les expérimentations ont été réalisées sur des souris Swiss. Ces souris non consanguines présentent l'avantage d'être simples à manipuler et peu onéreuses. Elles sont « polyvalentes » et utilisées dans tous les domaines de la recherche biomédicale, notamment dans les études en infectiologie.

Classiquement, les modèles de colonisation intestinale se déroulent en deux phases, une première étape de décolonisation par l'administration d'antibiotiques puis l'inoculation par voie orale de la bactérie étudiée. La revue de la littérature a mis en évidence l'existence de nombreux protocoles de décolonisation utilisant des molécules différentes à des concentrations et des durées d'administration différentes. Dans cette étude, nous avons comparé trois protocoles publiés et utilisés dans plusieurs études. Comme attendu, aucune colonie d'*E. faecium* n'était isolée dans les prélèvements du groupe contrôle n'ayant reçu aucun antibiotique avant l'inoculation de la suspension. En effet, en l'absence de facteurs chroniques perturbant sa composition initiale, tels que la prise d'antibiotiques au long cours ou les MICI, la flore intestinale est très stable au cours du temps. Par ailleurs, les modifications sont généralement transitoires si le facteur déclencheur n'est pas maintenu [145]. Le protocole A, associant de la gentamicine et de la clindamycine administrées avant l'inoculation puis aucun antibiotique, n'a pas permis d'obtenir une colonisation du tube digestif importante et stable comme décrit dans l'étude de Montealegre *et al.* [111]. Dans cette étude, les auteurs observaient une diminution de la charge bactérienne des BMF mais nettement moins importante que celle observée dans notre travail. En effet, nos résultats ne retrouvaient aucun EfRV isolé à partir de J10, remplacé progressivement par *E. faecalis*, une charge bactérienne d'environ 1×10^5 UFC/g était observé par Montealegre *et al.*. Le protocole antibiotique étant similaire de même que la lignée de souris utilisées, cette grande différence de résultats n'était pas attendue. Dans leur étude les auteurs ont comparé la capacité à coloniser le tube digestif de douze souches d'*E. faecium* appartenant aux différents clades décrit précédemment. Bien qu'une colonisation persistante mais plus faible était observée à J10-J14

avec la majorité des souches, la charge bactérienne des BMF était nulle à J14 pour une des souches du clade A2 (TX0133A). Ces résultats sont plus proches de ceux que nous avons obtenus avec la souche Aus0004. Ainsi, on peut supposer que « l'échec » de ce protocole dans notre travail pourrait être dû à la souche utilisée, possiblement moins apte à coloniser le tube digestif en l'absence de pression antibiotique persistante. Les deux autres protocoles étudiés dans un premier temps avaient recours à des céphalosporines. L'un associait de la ceftriaxone et de la céfoxitine, le second uniquement de la ceftriaxone [110,112]. Dans le protocole publié par Heikens *et al.*, la ceftriaxone utilisée en monothérapie était administrée par voie SC durant l'ensemble du protocole [112]. Dans ce travail, la ceftriaxone a été administrée par voie SC les deux jours précédant l'inoculation puis par voie orale, additionnée dans l'eau de boisson afin de réduire le nombre d'injections. Ces deux protocoles ont permis d'établir une colonisation à EfRV importante et stable au cours du temps. Néanmoins, l'isolement d'*E. faecalis* en fin de protocole nous a poussé à ajouter de l'amoxicilline à ces protocoles, les souches d'*E. faecalis* résistantes à cet antibiotique n'existant pas. Des résultats similaires étaient observés avec les deux derniers protocoles testés (D et E). Une colonisation importante du tube digestif et stable dans le temps était obtenue, sans colonisation parallèle par *E. faecalis*. Le protocole E associant uniquement deux molécules, très fréquemment utilisées en clinique humaine, il a été choisi pour le reste du travail.

Récemment, plusieurs études étudiant *E. faecium* dans un modèle de colonisation intestinale ont été publiées [146–149]. Dans ces études, les auteurs utilisaient de l'amoxicilline pour la décolonisation. Elle était administrée *via* l'eau de boisson pendant les sept jours précédant l'inoculation de la suspension bactérienne. Une colonisation stable et prolongée était obtenue. Ce protocole présente l'avantage d'être simple à réaliser et non invasif pour les animaux. En revanche la période d'administration de l'antibiotique est prolongée avant l'inoculation, ce qui peut

engendrer des contraintes logistiques et économiques qui, bien que « non scientifiques », sont à prendre en compte lors de la mise en place d'un modèle expérimental.

2. Endocardite infectieuse (EI)

Pour étudier les ARN régulateurs dans un contexte d'infection, un modèle d' EI aortique a été choisi. L'EI est une pathologie généralement monomicrobienne dans laquelle les entérocoques sont fréquemment impliqués. Bien qu'*E. faecalis* soit l'espèce responsable dans la majorité des cas, la proportion d'endocardite à *E. faecium* tend à augmenter [150]. La prise en charge thérapeutique de ces endocardites à *E. faecium* est plus difficile, notamment dans les pays où la prévalence des souches résistantes aux glycopeptides est élevée. Le modèle expérimental d'EI est décrit depuis de nombreuses années chez le lapin et le rat, et a été développé chez le lapin au cours de mon travail de Master 2 [19,151]. Le développement de l'EI repose sur l'induction d'une bactériémie après la pose d'un cathéter intra-ventriculaire entraînant la formation de microlésions au niveau de la valve aortique. L'endocardite était définie par la persistance d'une bactériémie associée à la présence de végétations ou des prélèvements cardiaques positifs à la culture.

2.1. Animaux

Des rats mâles, Sprague-Dawley âgés de 6 semaines, non consanguins et avec un statut sanitaire SPF ont été utilisés. Ils étaient hébergés par cage de deux, dans une pièce à température et luminosité contrôlées (cycle jour-nuit de 12h), et recevaient eau et nourriture stérilisées *ad libitum*. Les animaux étaient acclimatés à l'animalerie pendant une semaine et chaque rat était identifié par un numéro unique.

2.2. Déroulement du protocole

Une anesthésie générale était induite par injection de kétamine (80 mg/kg) et de xylazine (15 mg/kg) par voie intramusculaire. Les animaux étaient placés en décubitus dorsal et une incision longitudinale était réalisée au niveau du cou. La carotide droite était isolée et un cathéter en polyéthylène (PE10) était ensuite introduit jusqu'à obtention d'une résistance, témoignant de

l'apex du ventricule gauche. Le cathéter était ensuite fixé à l'artère, qui était remise en place avant suture de la peau. Les rats étaient inoculés *via* la veine caudale 24 heures après la pose du cathéter (J1) avec une suspension de 0,5 mL d'*E. faecium* calibrée. Les animaux étaient surveillés quotidiennement puis euthanasiés. Une ponction intracardiaque était réalisée afin d'ensemencer des flacons d'hémoculture incubés pendant 5 jours. Les animaux étaient ensuite euthanasiés par inhalation de CO₂. Les végétations ainsi que les organes (cœur, rein, rate et foie) étaient prélevés, pesés, broyés et mis en culture sur des géloses TS et BEA, incubées 24 heures en aérobie à 35+/-2°C, pour quantifier la charge bactérienne. Afin d'évaluer la durée la plus courte permettant d'obtenir un tableau d'infection, il a été décidé d'euthanasier des animaux respectivement 3, 5 ou 7 jours après l'inoculation (J4, J6, J8) (Figure 25).

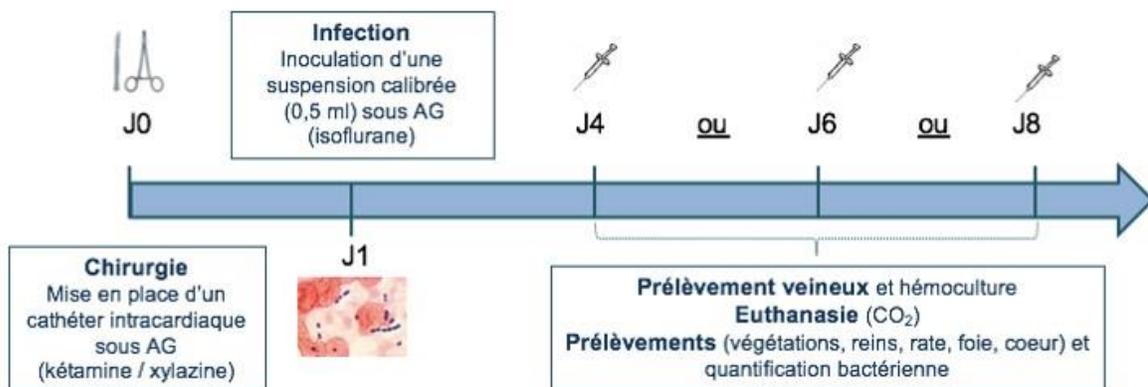


Figure 25. Protocole d'endocardite infectieuse.
AG : anesthésie générale

2.3. Résultats et Discussion

Vingt-quatre rats ont été opérés. Huit sont décédés avant d'être infectés, soit durant l'opération ($n = 4$), soit en post-opératoire précoce ($n = 4$). L'inoculum administré aux 16 animaux restant était en moyenne de 4×10^8 UFC/mL. Sur ces 16 animaux infectés à J1, aucun ne

présentait de bactériémie au moment de l'euthanasie (flacons d'hémocultures stériles), et quatre n'ont pas développé de végétation malgré un cathéter positionné au niveau de l'entrée du ventricule gauche pour deux d'entre eux. Quatre animaux ont été également exclus, le cathéter n'ayant pas atteint le ventricule gauche. Au total, huit rats présentaient des végétations au niveau du ventricule gauche (valve ou paroi) dont deux pour lesquels les prélèvements étaient positifs à *E. faecium*. Ces deux rats étaient décédés à J5. Un rat, décédé à J3, présentait des végétations positives à *E. faecium* mais une contamination par *S. aureus* des autres tissus prélevés. Une contamination de l'ensemble des prélèvements par *S. aureus*, des entérobactéries ou *L. murinus* était observée pour quatre rats. Enfin, des végétations stériles ont été observées chez un rat. En raison de ces résultats très mitigés et non exploitables, le protocole a été interrompu.

Au laboratoire, aucun modèle de chirurgie sur le rat n'avait été mis en place et de nombreuses difficultés ont été rencontrées lors de la transposition du protocole d'endocardite expérimentale du lapin au rat. Les premières difficultés étaient liées au geste chirurgical, notamment en raison de la taille de l'animal. Le cœur du rat pèse environ 250 mg soit dix fois moins que celui du lapin, rendant complexe la visualisation des valves ainsi que des végétations avec précision. De plus, l'artère carotide du lapin a un diamètre d'environ 2 mm alors que celle du rat à un diamètre d'environ 1 mm, cela rend sa manipulation plus délicate. Par ailleurs, il est possible d'insérer le cathéter dans la carotide de l'animal avec l'aide d'un trocart servant de guide mais là-encore, nous n'avons pas été en mesure de trouver un instrument de taille adaptée au modèle du rat. L'insertion sans guide a finalement été privilégiée mais était délicate en raison de la souplesse du cathéter. Pour ces raisons, les instruments de chirurgie disponibles au laboratoire se sont révélés inadéquats sur le rat. Ce modèle est utilisé depuis de nombreuses années et par plusieurs équipes et il serait intéressant de pouvoir collaborer dans l'avenir avec un laboratoire utilisant ce modèle sur le rat afin d'améliorer notre geste chirurgical. Nous avons également rencontré des difficultés sur la période post-opératoire précoce durant laquelle certains rats

décédaient sans lien direct avec le geste chirurgical. Après avoir pris avis auprès d'un vétérinaire spécialisé nous avons modifié quelques paramètres, tels qu'une réhydratation par voie sous cutanée plus importante et le maintien sur un dispositif chauffant jusqu'au réveil de l'animal, permettant un meilleur rétablissement des animaux.

Les secondes difficultés étaient liées à la contamination des prélèvements. Sur les prélèvements des huit rats présentant des végétations, la majorité était contaminée, notamment par du *S. aureus*. L'origine de ces contaminations n'a pu être déterminée. Une contamination au moment de la mise en culture des prélèvements a été exclue, certains prélèvements réalisés au même moment n'étant pas contaminés. Les animaux utilisés avaient un statut SPF. Ce statut garantit l'absence des principaux agents infectieux responsables d'infections chez les animaux mais *S. aureus* ne fait pas partie des microorganismes recherchés. Par conséquent, il serait intéressant de réaliser des prélèvements de contrôle au niveau de différents sites anatomiques tels que la peau ou le museau pour écarter une contamination endogène.

Ce protocole nécessitant un temps de mise au point trop important pour être abouti dans le cadre de cette thèse, il a été interrompu. Un nouveau protocole d'infection systémique a été réfléchi et le choix s'est porté sur un modèle d'infection systémique secondaire à une translocation digestive.

3. Translocation bactérienne intestinale (TBI)

L'objectif du protocole était d'induire une neutropénie, chez des souris préalablement colonisées à *E. faecium*, entraînant la translocation bactérienne du système digestif vers la circulation générale afin d'observer un tableau d'infection systémique. Un modèle d'induction de neutropénie par injection de cyclophosphamide (CTX) a été choisi dans ce travail.

3.1. Animaux

Des souris femelles Swiss âgées de 6 semaines, non consanguines, au statut « SPF » ont été utilisées. Elles étaient hébergées dans les mêmes conditions que celles utilisées dans le protocole de colonisation intestinale.

3.2. Protocoles et Interprétation des résultats

Le premier protocole est détaillé sur la Figure 26. Les souris étaient colonisées avec la souche d'*E. faecium* Aus0004 selon les modalités du protocole décrit plus haut. La décolonisation préalable à l'administration de la suspension bactérienne était obtenue avec le protocole E associant ceftriaxone et amoxicilline. A J7, la colonisation intestinale était confirmée pour chaque souris par la quantification d'*E. faecium* dans une BMF prélevée par massage abdominal. Deux injections de CTX étaient ensuite réalisées par voie IP à J7 (150 mg/kg) et J9 (100 mg/kg). Les souris étaient ensuite surveillées quotidiennement (poids, température, aspect et comportement). A J11, un prélèvement sanguin était réalisé au niveau de la veine mandibulaire afin de réaliser une numération sanguine (Beckman Coulter LH, Beckman Coulter) et une formule leucocytaire comptée manuellement. A partir de J11, une souris par cage et par jour était euthanasiée par inhalation de CO₂. Avant l'euthanasie, une ponction intracardiaque était réalisée, permettant d'obtenir un prélèvement sanguinensemencé dans un flacon d'hémoculture incubé cinq jours. La rate, le foie, un rein et le caecum (vidé de son contenu) étaient ensuite prélevés, pesés, broyés et mis en culture sur des géloses TS et BEA, incubées 24 heures en aérobie à 35+/-2°C, afin de

quantifier la charge bactérienne. Un test non paramétrique de Mann-Whitney était réalisé pour les comparaisons statistiques entre les deux groupes.

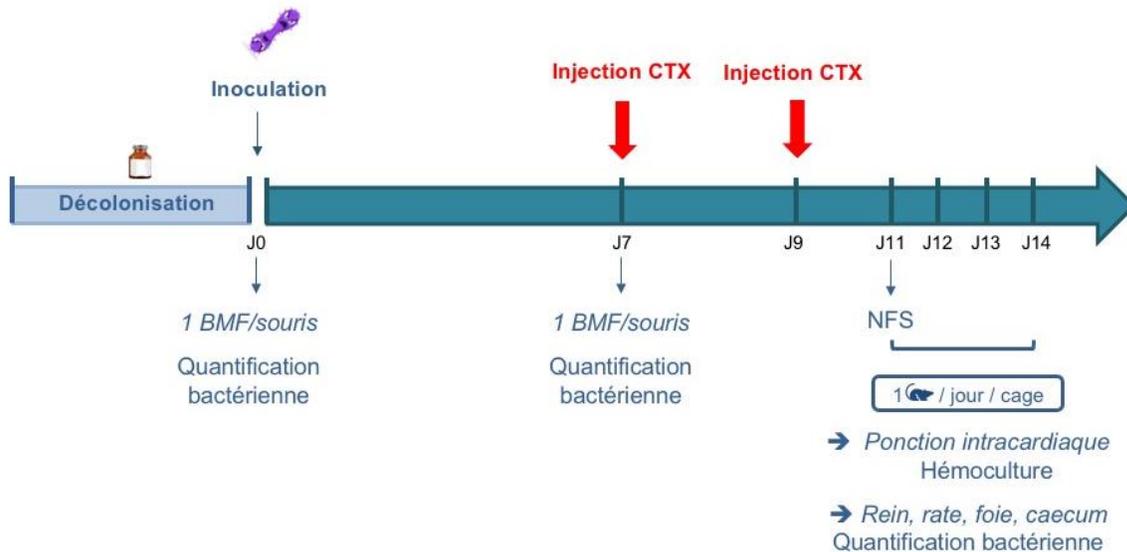


Figure 26. Translocation intestinale : protocole expérimental.

BMF : boulette de matières fécales, CTX : cyclophosphamide, NFS : numération formule sanguine.

Ce protocole a été réalisé sur deux cages de cinq souris (groupe neutropénique CTX), et cinq souris recevant deux injections de NaCl 0,9% ont été utilisées comme groupe témoin (T). La suspension d'*E. faecium* utilisée pour l'étape de colonisation intestinale avait une concentration de $3,63 \times 10^8$ UFC/mL. La leucopénie était définie par un taux de leucocytes < 6 G/L et la neutropénie par un taux de polynucléaires neutrophiles $< 0,1$ G/L. Toutes les souris ayant reçu du CTX étaient neutropéniques à J11 (Table 1).

Tableau 1. Résultat des NFS obtenues avec le premier protocole et valeurs normales pour la souris Swiss (données fournisseur).

Souris	Groupe	Leucocytes (G/L)	Neutrophiles (G/L)	Leucopénie (Leuco < 6 G/L)	Neutropénie (Neutro < 0,1 G/L)	Paramètres	Femelle
1	CTX	1,9	0	oui	oui	Globules rouges (10 ¹² /l)	9,0 ± 0,8
2	CTX	2,3	0,05	oui	oui	Hématocrite (l/l)	0,53 ± 0,04
3	CTX	1	0,02	oui	oui	VGM (fl)	59 ± 1
4	CTX	2,1	0,02	oui	oui	TCMH (pg)	16,7 ± 0,9
5	CTX	0,6	0,01	oui	oui	CCMH (g/dl)	28 ± 1
6	CTX	2	0	oui	oui	Plaquettes (10 ⁹ /l)	1059 ± 137
7	CTX	1,5	0	oui	oui	Leucocytes (10 ⁹ /l)	9,3 ± 3,1
8	CTX	0,8	0,01	oui	oui	Neutrophiles (10 ⁹ /l)	1,41 ± 0,58
9	CTX	1	0,01	oui	oui	Lymphocytes (10 ⁹ /l)	7,26 ± 2,49
10	CTX	2,8	0,03	oui	oui	Eosinophiles (10 ⁹ /l)	0,38 ± 0,16
11	T	5,8	0,46	oui	non	Monocytes (10 ⁹ /l)	0,14 ± 0,06
12	T	7,5	2,5	non	non	Basophiles (10 ⁹ /l)	0,08 ± 0,05
13	T	8,6	1,72	non	non		
14	T	7,1	1,14	non	non		
15	T	12,6	0,76	non	non		

Des résultats exploitables ont été obtenus pour 13 souris. Deux souris ont été exclues, une dans le groupe CTX et une dans le groupe T, car non colonisées à la fin du protocole (charge bactérienne du caecum < 10⁷ UFC/g). Aucune souris ne présentait de bactériémie au moment de l'euthanasie, toutes les hémocultures étaient négatives après cinq jours d'incubation. Concernant la charge bactérienne des différents prélèvements tissulaires, celles-ci étaient faibles et aucune différence significative n'était observée entre le groupe neutropénique et le groupe témoin. La majorité des prélèvements étaient stériles (6/9 et 2/4 reins ; 6/9 et 3/4 rates ; 7/9 et 2/4 foies respectivement dans les groupes CTX et T). Dans le rein, un inoculum moyen de 2,07 x 10⁴ et 1,35 x 10⁴ UFC/g était retrouvé dans le groupe CTX et T, respectivement. Une charge bactérienne moyenne de 3,99 x 10⁴ UFC/g était observée dans la rate des souris du groupe CTX. Dans le groupe T, la charge bactérienne moyenne des rates était de 4,98 x 10⁴ UFC/g. Enfin 7,90 x 10³ UFC/g et 1,50 x 10³ UFC/g d'*E. faecium* étaient isolés dans le foie des souris des groupes CTX et T respectivement. Ces résultats sont synthétisés sur la Figure 27.

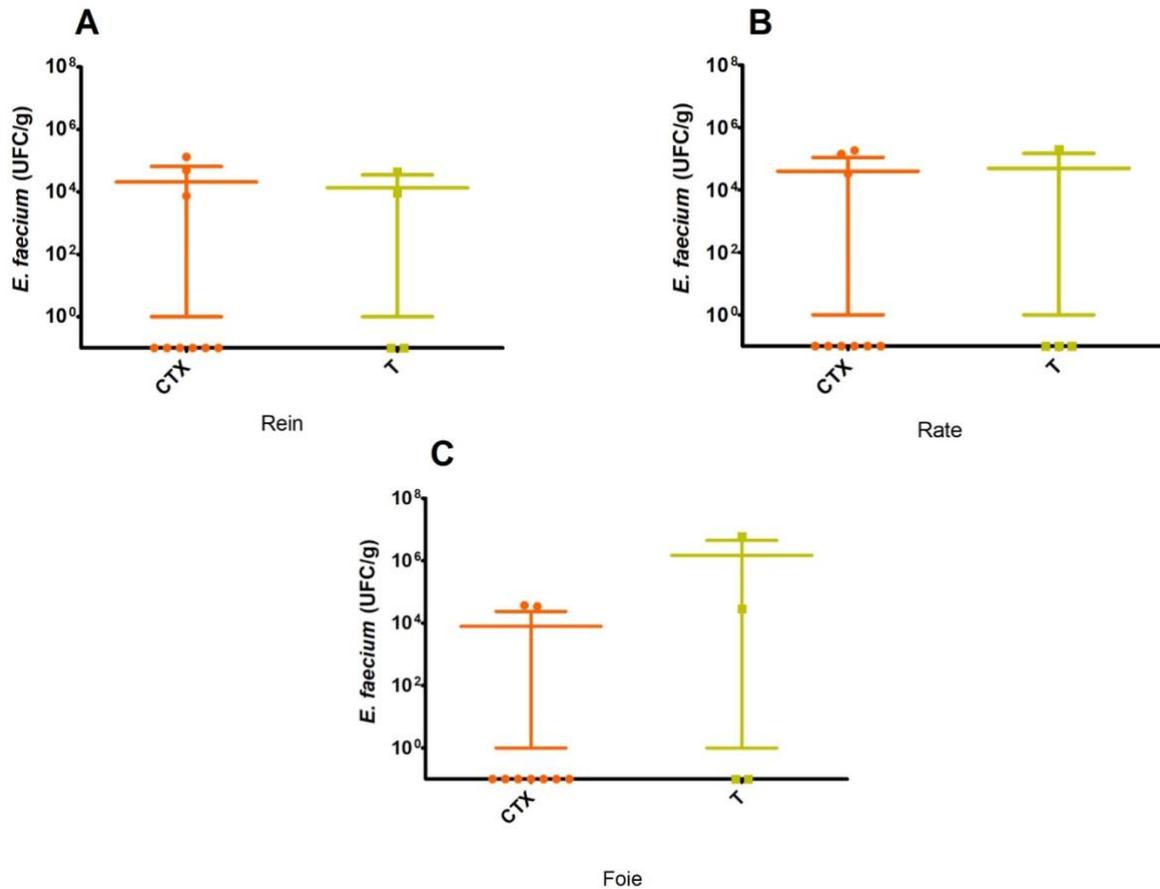


Figure 27. Charge bactérienne des reins (A), rates (B) et foies (C) des souris rendues neutropéniques (CTX) et témoins (T).

Ces premiers résultats ont permis de valider le protocole d'injections de CTX, toutes les souris étant neutropéniques avec une neutropénie profonde deux jours après la deuxième injection. En revanche, la majorité des prélèvements tissulaires étaient stériles dans les deux groupes. Quelques prélèvements étaient faiblement positifs mais sans différence significative entre les groupes neutropénique et témoin, laissant supposer qu'une légère translocation bactérienne du tube digestif vers la circulation générale était survenue, mais de façon transitoire et non suffisamment importante pour occasionner un tableau d'infection généralisée. La neutropénie induite par CTX étant transitoire, la NFS réalisée à J11 ne permettait pas de confirmer

la persistance de la neutropénie jusqu'à J14 [152]. A l'aide de ces premières données, il a été décidé de définir un nouveau protocole, avec une injection supplémentaire de cyclophosphamide à J11 (100 mg/kg) et la réalisation de la NFS au moment de l'euthanasie. Comme précédemment, un groupe de dix souris a reçu du CTX (groupe CTX) et un groupe témoin de cinq souris a reçu du NaCl 0,9% (T). Une souris T et deux souris CTX ont été euthanasiées chaque jour entre J12 et J16. Une ponction intracardiaque effectuée avant l'euthanasie a permis d'obtenir un prélèvement sanguin d'environ 900 μ L à partir duquel une NFS a été réalisée et un flacon d'hémoculture a été ensemencé. Comme dans le premier protocole, un rein, la rate, le foie et le caecum ont été prélevés pour quantifier la charge bactérienne. Ce deuxième protocole est résumé sur la Figure 28.

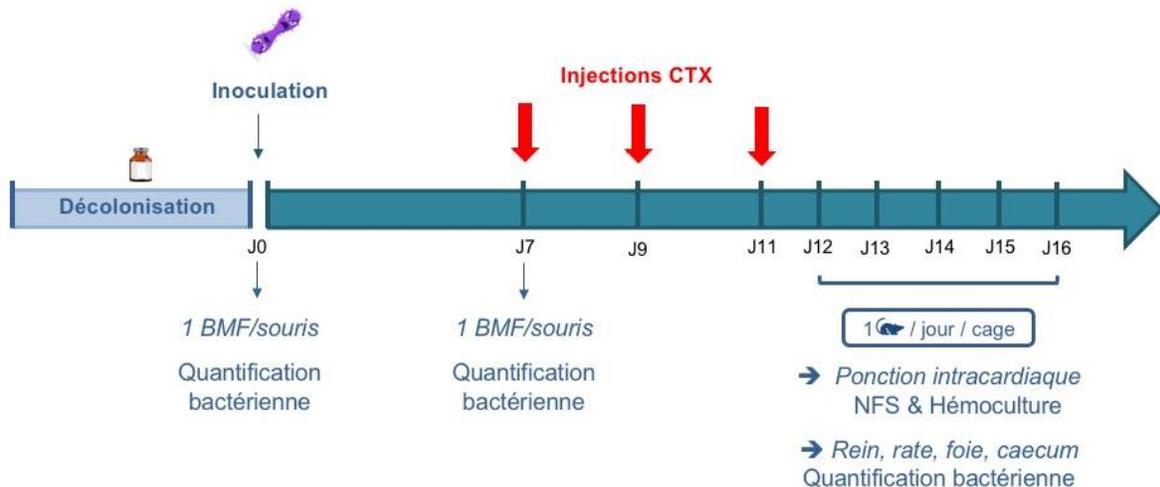


Figure 28. Translocation intestinale : protocole expérimental modifié.

BMF : boulette de matières fécales, CTX : cyclophosphamide, NFS : numération formule sanguine.

Les souris ont été colonisées avec une suspension d'*E. faecium* ayant une concentration de $2,55 \times 10^9$ UFC/g et toutes les souris étaient colonisées au moment de l'euthanasie avec une charge bactérienne moyenne des caecum égale à $1,49 \times 10^9$ UFC/g. Une souris du groupe CTX a été

exclue, la ponction cardiaque n'ayant pas permis d'obtenir un prélèvement sanguin en quantité suffisante. Une neutropénie profonde a été induite chez 9 souris sur 10 dans le groupe CTX (Table 2). La souris considérée non neutropénique avait néanmoins un taux de polynucléaires neutrophiles inférieur à la normale. Une leucopénie était observée chez quatre souris du groupe témoin, mais aucune d'entre elle n'était neutropénique.

Tableau 2. Résultat des NFS obtenus avec le deuxième protocole

Souris	Groupe	Euthanasie	Leucocytes (G/L)	Neutrophiles (G/L)	Leucopénie (Leuco < 6 G/L)	Neutropénie (Neutro < 0,1 G/L)
1	CTX	J14	0,2	0	oui	oui
2	CTX	J15	0,9	0	oui	oui
3	CTX	J16	1,4	0	oui	oui
4	CTX	J12	1,2	0	oui	oui
5	CTX	J13	1,1	0,04	oui	oui
6	CTX	J12	0,7	0	oui	oui
7	CTX	J13	-	-	-	-
8	CTX	J15	2,1	0	oui	oui
9	CTX	J16	2,6	0,17	oui	non
10	CTX	J14	1,4	0	oui	oui
11	T	J15	7,1	5,54	non	non
12	T	J13	3,8	0,79	oui	non
13	T	J12	4,2	0,96	oui	non
14	T	J14	1,1	0,14	oui	non
15	T	J16	5,1	1,17	oui	non

Une souris du groupe T a été exclue, ses prélèvements étant contaminés. Toutes les hémocultures étaient négatives. Comme observé avec le premier protocole, la majorité des prélèvements tissulaires étaient stériles ($n = 6/9$ CTX et $n = 2/4$ T), et aucune différence significative n'était observée entre les prélèvements, faiblement positifs, des souris des groupes CTX et T (Figure 29), suggérant une translocation faible non liée à l'induction de la neutropénie. Paradoxalement, la charge bactérienne dénombrée dans le foie était plus importante dans le groupe témoin que dans le groupe CTX ($2,35 \times 10^3$ vs $6,01 \times 10^1$ UFC/g).

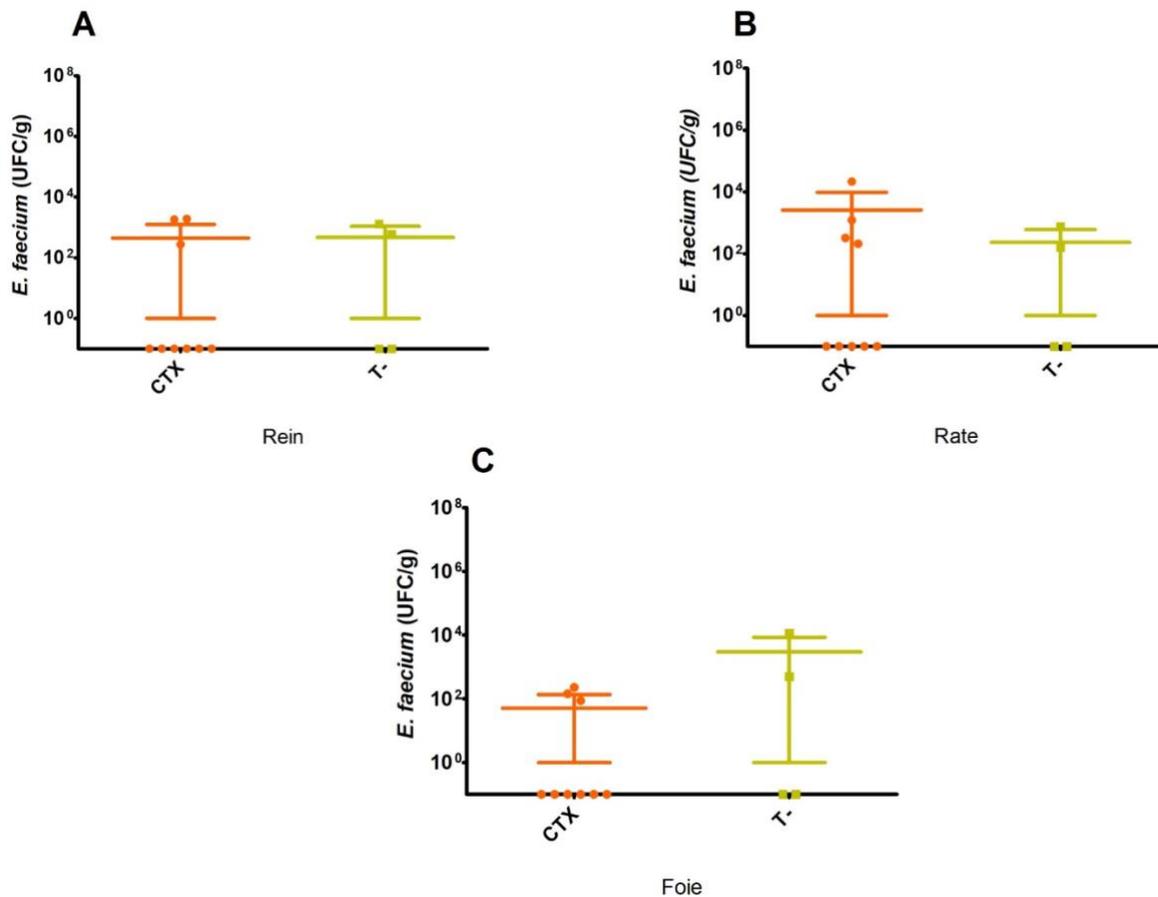


Figure 29. Charge bactérienne des reins (A), rates (B) et foies (C) des souris rendues neutropéniques (CTX) et témoins (T).

Aucun tableau d'infection généralisée n'a été observé chez ces souris. Ces résultats ont permis de montrer que la neutropénie induite par les trois injections de CTX était profonde et stable plusieurs jours après la dernière injection. En revanche, ce protocole ne permettait pas, comme le premier, d'obtenir une translocation intestinale suffisante pour obtenir un tableau d'infection généralisée.

Plusieurs hypothèses pouvant expliquer ces résultats ont été émises. En premier lieu, une virulence potentiellement insuffisante de la souche d'*E. faecium* utilisée (Aus0004) a été évoquée.

Néanmoins cette hypothèse semble peu probable car la souche Aus0004 est une souche clinique isolée au cours d'une bactériémie chez l'Homme. Afin de tester malgré tout cette hypothèse, ce même protocole a été testé avec deux souches d'*E. coli* (ATCC 35218 et CFT037). Chacune des deux souches a été inoculée à cinq souris ayant suivi au préalable un protocole de colonisation adapté à *E. coli*. Les souris ont été décolonisées par administration de ceftriaxone et d'amoxicilline selon les mêmes modalités que précédemment (protocole E), de la vancomycine (0,5 mg/mL) était ajoutée à l'eau de boisson afin d'éviter une recolonisation par les bactéries à Gram positif. Comme précédemment, la charge bactérienne dans les BMF était quantifiée avant la première injection de CTX pour s'assurer de la colonisation intestinale. Une souris de chaque cage a été euthanasiée chaque jour à partir de J12. Comme précédemment des prélèvements tissulaires (rein, rate, foie) et sanguin ont été réalisés à visée bactériologique. Les souris ont été colonisées avec un inoculum moyen de $5,35 \times 10^9$ UFC/mL. Une colonisation intestinale a été observée avant les injections de CTX avec une charge bactérienne moyenne d'environ $4,5 \times 10^8$ UFC/g. Aucune hémoculture ne s'est positivée, et tous les prélèvements tissulaires étaient stériles. Ce nouveau protocole, comme les deux précédents, n'a donc pas permis d'aboutir à une TBI.

L'étude ayant servi de référence pour la mise en place de ce modèle est une étude japonaise publiée en 2001, évaluant la survenue d'une bactériémie secondaire à une TBI induite par différents protocoles [134]. Des souris étaient colonisées par administration orale d'une suspension d'entérocoques après qu'une neutropénie ait été induite par injection de CTX. En parallèle de l'injection de CTX, différents antibiotiques étaient administrés pour évaluer leur impact sur la TBI. Les auteurs ont comparé plusieurs souches d'*E. faecalis* et d'*E. faecium* résistantes à la vancomycine, isolées de prélèvements cliniques. Le taux de mortalité obtenu avec les souches d'*E. faecium* était trois fois plus faible que celui observé chez les souris colonisées avec *E. faecalis* (10 vs 30%). Ce résultat pourrait corroborer l'hypothèse selon laquelle la virulence de la souche d'*E. faecium* utilisée dans notre travail était potentiellement trop faible. Cette hypothèse est

cependant à considérer avec précaution, les souches d'*E. faecium* utilisées par l'équipe de Miyazaki étant différentes d'Aus0004. Une bactériémie sans atteinte tissulaire était observée pour la majorité des souris rendus neutropéniques. Un tableau d'infection généralisée (contamination du foie, de la rate et des ganglions mésentériques) était observé chez les souris ayant reçu une triple antibiothérapie (vancomycine, kanamycine et métronidazole) en parallèle des injections de CTX. Ces résultats confirment la nécessité d'une antibiothérapie associée à l'injection de CTX pour obtenir un tableau d'infection généralisée. Les antibiotiques utilisés dans notre protocole étant différents cela pourrait, en partie, expliquer les résultats obtenus dans ce travail. Ces résultats ont été obtenus avec une souche d'*E. faecalis*, la souche d'*E. faecium* n'ayant pas été testée. Par conséquent, il est difficile de transposer ces conclusions directement à notre travail, mais cette étude permet d'envisager des modifications à apporter à notre modèle. Enfin, les auteurs japonais ont réalisé leur étude sur 13 lignées de souris, obtenant des résultats très variables en fonction de la lignée. Un taux de mortalité plus important était observé avec la lignée C57BL/6. Ce résultat est en accord avec une autre étude concluant à une sensibilité hétérogène des lignées face à l'infection par un même pathogène [93]. Aux vues de ces informations, des modifications doivent être apportées à notre protocole afin d'obtenir les résultats souhaités. Ainsi, il serait souhaitable de changer de lignée de souris et d'utiliser des C57BL/6. De plus une modification des antibiotiques administrés pourrait permettre de faciliter la TBI.

ÉTUDE D'Ern0160

1. Contexte

Comme décrit précédemment, 61 sARN (Ern) ont été identifiés chez *E. faecium* et dix ont été validés expérimentalement. Parmi eux, le sARN_0160 (Ern0160) est apparu conservé chez toutes les souches d'*E. faecium* étudiées, quel que soit le clade considéré [81]. Dans cette même étude, Sinel *et al.* ont montré d'une part qu'*ern0160* était fortement exprimé, et d'autre part que son expression était significativement diminuée en présence de CSI de daptomycine. Plus récemment, une étude réalisée au sein du laboratoire, a évalué l'expression des sARN de *S. aureus* et d'*E. faecium* en présence de CSI de biocides. Les auteurs ont observé que l'expression d'*ern0160* était significativement diminuée en présence de certains biocides et ainsi conclu qu'Ern0160 pourrait être impliqué dans la réponse au stress induit par les biocides [153]. Les résultats positifs de ces deux premières études sur les sARN d'*E. faecium* nous ont conduits à envisager Ern0160 comme un bon candidat pour l'étude *in vivo* dans le modèle de colonisation intestinale pour ainsi explorer son implication dans le processus de colonisation d'*E. faecium*. L'étude des sARN est fréquemment réalisée en utilisant des souches délétées du sARN étudiés et des souches le surexprimant. Ce procédé a donc été utilisé dans ce travail.

2. Objectifs et méthodologie

Afin d'étudier le rôle d'*ern0160* dans la colonisation intestinale, quatre souches isogéniques ont été étudiées *in vitro* puis *in vivo* :

- **Aus0004** (WT) : souche d'*E. faecium* de référence [139], résistante aux glycopeptides (*vanB*) isolée d'une bactériémie et appartenant au CC17
- **Δ0160** : souche mutante de WT, délétée de l'*ern0160*
- **Δ0160_0160** : souche Δ0160 *trans*-complémentée avec le plasmide pAT29 surexprimant *ern0160*.

- **Δ0160_pAT29** : souche Δ0160 *trans*-complémentée avec le plasmide pAT29 vide

La construction de ces souches a fait l'objet d'un travail de Master 2 et de thèse de Sciences réalisé au laboratoire par le Dr. Killian Le Neindre [154].

Ces quatre souches ont été étudiées en culture *in vitro* puis *in vivo* dans le modèle de colonisation intestinale développé précédemment. Les expérimentations *in vitro* consistaient à réaliser des courbes de croissance en milieu BHI. Les quatre souches ont été étudiées seules puis en compétition deux à deux (WT vs Δ0160 et Δ0160_0160 vs Δ0160_pAT29) afin que les souches délétées et *trans*-complémentée soient comparées à des souches pour lesquelles seule la présence d'*ern0160* différait et ainsi diminuer les risques de biais. Les analyses *in vitro* ont été réalisées sur trois réplicats et les essais *in vivo* sur trois cages de cinq souris. Pour analyser les résultats de co-culture et de co-colonisation, des PCR étaient réalisées sur chaque prélèvement, directement à partir de 28 colonies pour la co-culture et 12 colonies pour la co-colonisation. Un index de compétition (IC) normalisé (ICn) était ensuite calculé de façon suivante :

- Pour le couple WT – Δ0160

$$IC = \frac{\text{nombre de colonies } \Delta 0160}{\text{nombre de colonies WT}}$$

$$ICn = \frac{IC \text{ au temps } t}{ICt0}$$

- Pour le couple Δ0160_0160 – Δ0160_pAT29

$$IC = \frac{\text{nombre de colonies } \Delta 0160_{\Delta 0160}}{\text{nombre de colonies } \Delta 0160_{pAT29}}$$

$$ICn = \frac{IC \text{ au temps } t}{ICt0}$$

Pour les résultats de co-colonisation, l'ICt0 correspondait à l'IC calculé à partir de l'inoculum administré. Pour les analyses *in vitro*, un ICn moyen était calculé à partir des valeurs des trois réplicats. Dans le modèle animal, l'ICn était calculé pour chacune des 15 souris colonisées et un ICn médian était calculé pour l'analyse statistique. Un ICn égal à 1 signifiait que les deux souches

étaient en proportions équivalentes. Un ICn inférieur à 1 signifiait que la souche WT ou $\Delta 0160_pAT29$ était prédominante. Enfin, si l'ICn était supérieur à 1, la souche $\Delta 0160$ ou $\Delta 0160_0160$ était prédominante.

Préalablement aux études de colonisation, nous avons vérifié la stabilité du plasmide *in vivo*. Pour ce faire 5 souris ont été colonisées selon le protocole décrit précédemment avec la souche $\Delta 0160_pAT29$. Des prélèvements de BMF ont été réalisés à J3, J5, J7 et J10 et mis en culture sur géloses TS et TSspec, incubées 24 heures en aérobie à 35+/-2°C. La stabilité du plasmide était évaluée par le pourcentage de colonies contenant pAT29 calculé par le ratio entre le nombre de colonies quantifiées sur gélose TSspec et le nombre de colonies quantifiées sur gélose TS. A J3, 94% des colonies contenaient le plasmide et 75% à J10, ces résultats étaient cohérents avec les données de la littérature [155].

3. Principaux résultats

3.1. *In vitro*

En culture seule, aucune différence de croissance n'était observée entre les souches WT et $\Delta 0160$. En revanche, il est apparu que $\Delta 0160_0160$ avait une croissance plus lente que $\Delta 0160_pAT29$. La phase stationnaire était atteinte avec un retard d'approximativement deux heures par rapport à la souche $\Delta 0160_pAT29$. De plus, la densité optique à 600 nm (DO_{600}) maximale atteinte à la phase stationnaire était également plus faible (Figure 30). En raison de cette différence de croissance, l'association « $\Delta 0160_0160 + \Delta 0160_pAT29$ » n'a pas été étudiée en co-culture.

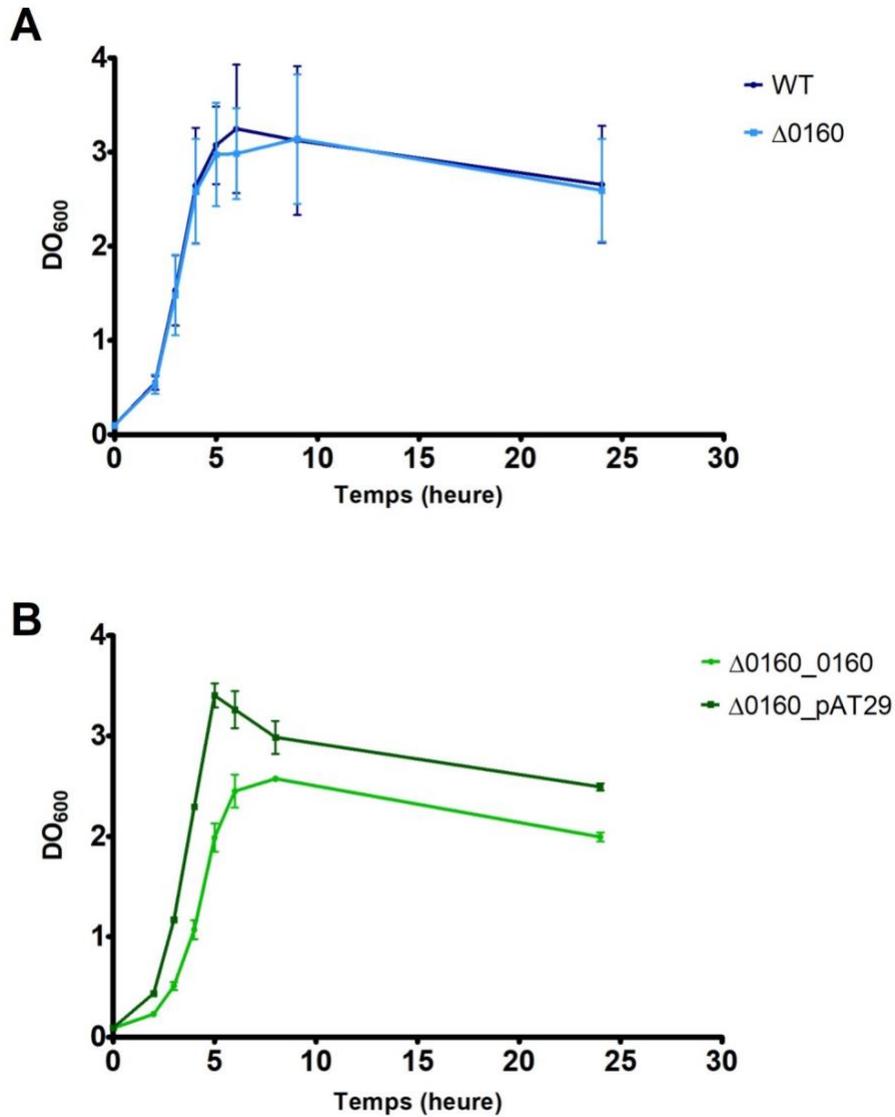


Figure 30. Courbes de croissances obtenues avec les souches WT et Δ0160 (A), Δ0160_0160 et Δ0160_pAT29 (B).
Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type.

Les résultats obtenus avec l'association « WT + Δ0160 » en co-culture sont représentés sur la Figure 31. Jusqu'à T9, l'ICn n'était pas significativement différent de 1, les deux souches étaient donc présentes en quantités équivalentes. A T24, la valeur de l'ICn moyen était de 0,57 et significativement inférieure à 1 ($p = 0,02$), la souche WT était donc majoritaire par rapport à la souche Δ0160.

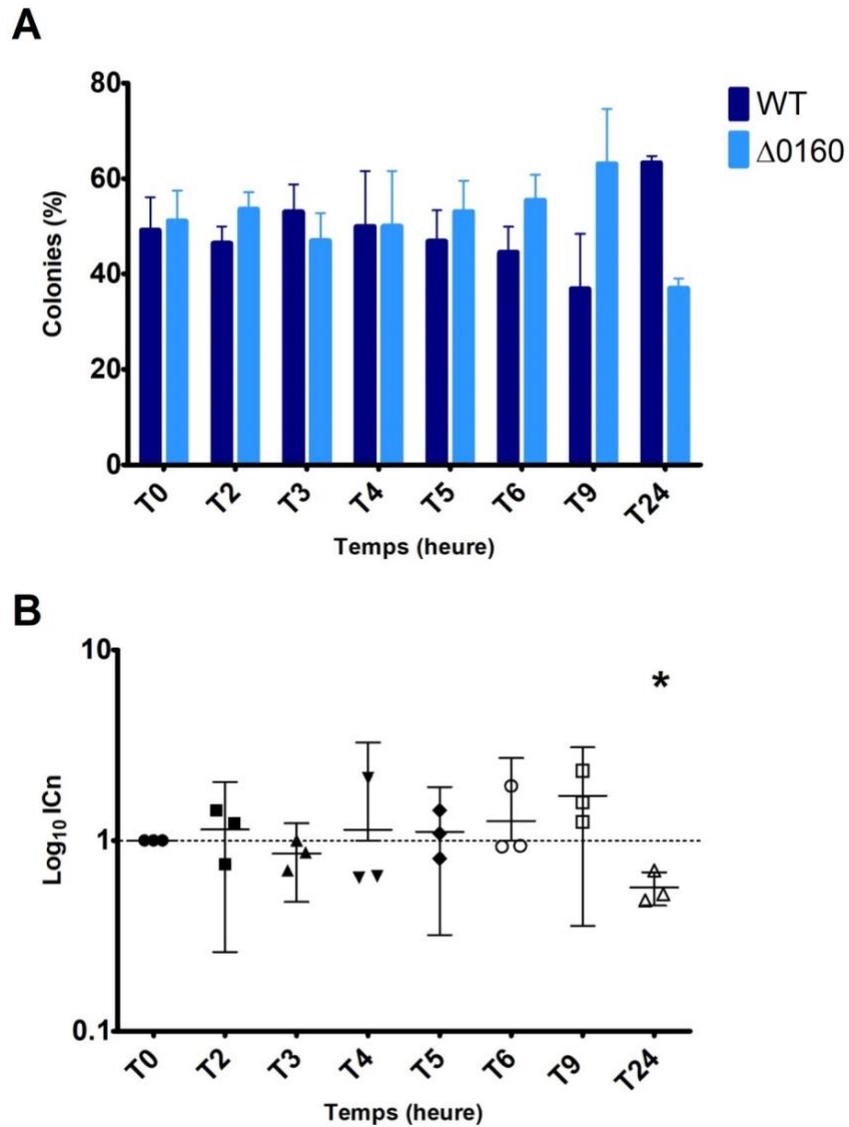


Figure 31. Co-culture WT – 0160.

- (A) Pourcentage moyen de chaque souche au cours du temps calculé sur 28 colonies pour chacun des trois réplicats, les barres d'erreurs correspondent à l'écart type.
- (B) ICn calculé pour chacun des trois réplicats, les barres représentent la moyenne et l'intervalle de confiance à 95%.

3.2. *In vivo*

De façon similaire, les expérimentations avec les souches seules et en compétition ont été réalisées *in vivo*. Chacune des quatre souches a été administrée isolément puis en association deux à deux dans une suspension. Les six protocoles ont donc été réalisés sur des groupes comprenant 15 souris, selon les modalités du modèle de colonisation intestinale décrit précédemment. Aucune différence significative de colonisation n'a été observée avec les souches étudiées isolément, les souris étaient colonisées de façon équivalente avec chacune des quatre souches pendant les 10 jours du protocole (Figure 32).

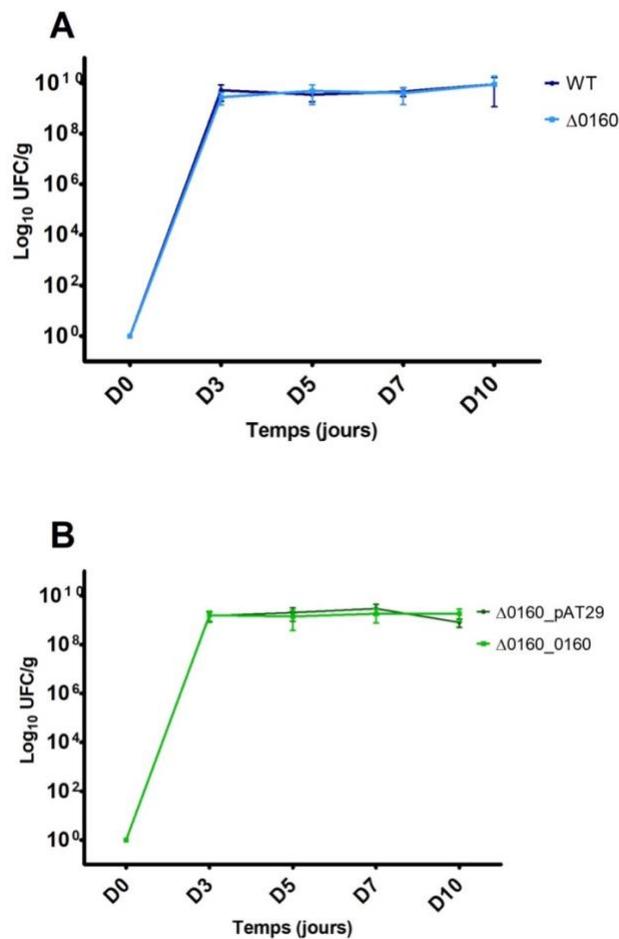


Figure 32. Charge bactérienne moyenne contenue dans les BMF avec les souches WT et Δ0160 (A), Δ0160_0160 et Δ0160_pAT29 (B).
Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type.

Les résultats obtenus avec la co-colonisation étaient quant à eux significatifs. Dans le protocole de co-colonisation associant les souches WT et $\Delta 0160$, L'ICn médian était significativement inférieur à 1 dès J5 ($p = 0,01$) et diminuait progressivement jusqu'à J10 où la valeur de l'ICn médian était de 0,25 ($p = 0,001$) (Figure 33).

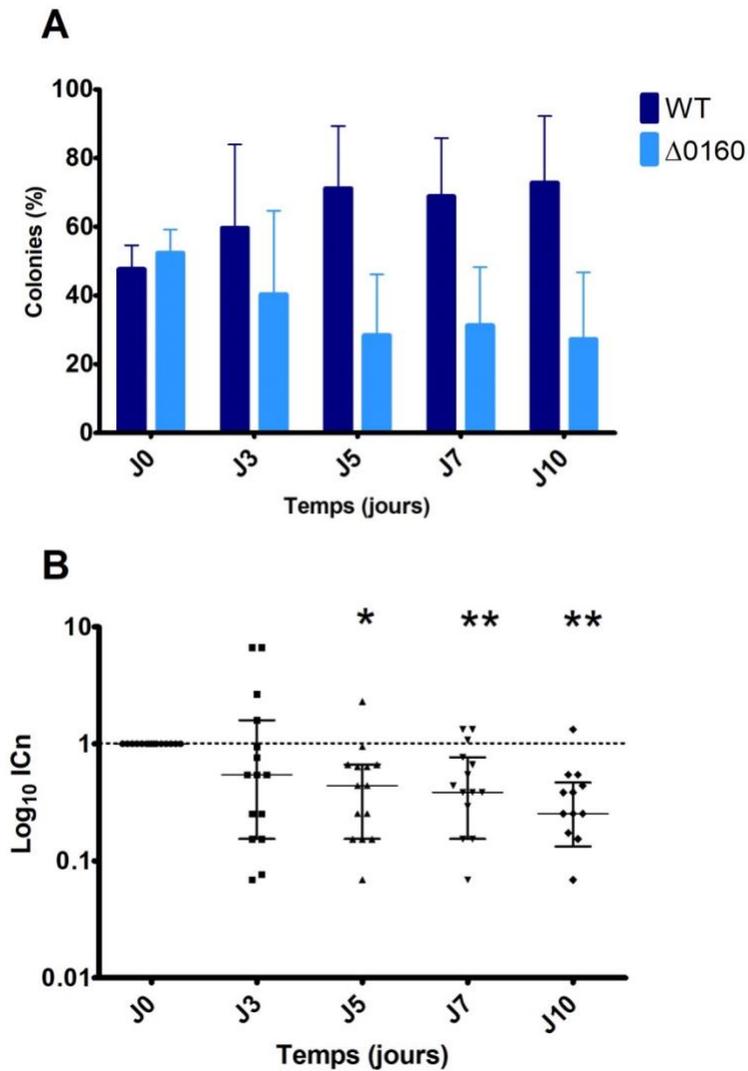


Figure 33. Co-colonisation avec les souches WT et $\Delta 0160$.

- (A) Pourcentage moyen et écart-type de chacune des souches au cours du temps.
 (B) ICn calculé pour chaque souris au cours du temps. Les barres représentent l'ICn médian et l'intervalle interquartile.

Le modèle de co-colonisation étudiant l'association « $\Delta 0160_{0160}$ + $\Delta 0160_{pAT29}$ » a également permis d'observer des résultats significatifs. Contrairement au protocole co-colonisation avec la suspension « WT – $\Delta 0160$ » où l'inoculum administré était équilibré (50% de chaque souche), l'équilibration de l'inoculum de la suspension « $\Delta 0160_{0160}$ + $\Delta 0160_{pAT29}$ » a été difficile et contenait environ 60% de souche $\Delta 0160_{pAT29}$ et 40% de souche $\Delta 0160_{0160}$. Ensuite, dès J3 la souche $\Delta 0160_{pAT29}$ était très largement majoritaire parmi les colonies testées, l'ICn normalisé était inférieur à 0,1, et ce jusqu'à la fin du protocole. Chez certaines souris, la souche $\Delta 0160_{pAT29}$ représentait 100% des colonies testées à J10.

4. Discussion

Cette étude est la première à explorer *in vivo* les ARN régulateurs d'*E. faecium* et leur fonction potentielle dans la colonisation intestinale. Parmi les 61 Ern mis en évidence au laboratoire en 2017, Ern0160 est apparu comme le meilleur candidat à évaluer dans notre modèle de colonisation intestinale expérimentale, et ce, pour plusieurs raisons. Il était conservé dans toutes les souches étudiées, qu'elles appartiennent au clade A1, A2 ou B [81]. Cette conservation au sein des souches commensales et pathogènes est en faveur d'une implication de l'Ern0160 dans le processus de colonisation intestinale, celui-ci étant une caractéristique commune aux deux types de souches. De plus, les auteurs ont montré qu'*ern0160* était fortement exprimé dans la souche Aus0004. Cette souche appartient au CC17, qui regroupe des souches particulièrement adaptées à l'environnement hospitalier. Ainsi, Ern0160 pourrait également être impliqué dans les mécanismes d'adaptation. Cette hypothèse est reprise dans une étude réalisée récemment au laboratoire, dans laquelle l'expression des Ern était étudiée en présence de CSI de biocides [153]. Les auteurs ont observé une diminution significative de l'expression d'*ern0160* en présence de certains biocides utilisés en milieu hospitalier. D'après ces résultats, ils ont conclu qu'Ern0160

pourrait être impliqué dans la réponse au stress induit par les biocides. Un rôle d'Ern0160 dans les mécanismes de résistance aux antibiotiques a également été envisagé, Sinel *et al.* ayant montré qu'*ern160* était significativement moins exprimé en présence de CSI de daptomycine.

L'implication d'Ern0160 dans la colonisation intestinale a été évaluée *in vitro* et *in vivo* à l'aide de quatre souches. La souche Δ 0160, délétée d'*ern0160* a été comparée à la souche sauvage Aus0004, puis elle a été mise en compétition avec cette dernière. *In vitro*, les deux souches, étudiées isolément, avaient des courbes de croissance similaires. En revanche après 24 heures de co-culture, la souche sauvage devenait légèrement prédominante. Ces expériences, réalisées en milieu BHI dont la composition est très éloignée de celle du tube digestif, ne permettaient pas à elles seules d'interpréter ces résultats. Des résultats similaires ont été observés dans le modèle de compétition *in vivo*, la souche sauvage était significativement prédominante après trois jours de colonisation et jusqu'à la fin du protocole. Ces résultats suggèrent qu'Ern0160 pourrait être impliqué dans le processus de colonisation du tube digestif, son absence semblant avoir un effet délétère sur la capacité de la bactérie à coloniser le tube digestif. Pour compléter ces résultats, les mêmes expériences *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées avec la souche Δ 0160_0160, délétée et *trans*-complémentée, surexprimant *ern0160*. La souche Δ 0160_pAT29, *trans*-complémentée avec le vecteur vide a été utilisée comme contrôle, afin de comparer des souches ayant des coûts de fitness supposés similaires. Les courbes de croissance *in vitro* réalisées avec les deux souches séparément ont montré que croissance de la souche Δ 0160_0160 était retardée par rapport à la souche contrôle. La surexpression d'*ern0160* induit probablement un coût énergétique pour la bactérie, ce qui pourrait expliquer la différence de cinétique observée. *In vivo*, aucune différence de colonisation n'était observée avec les souches inoculées isolément. Dans le modèle de co-colonisation, la souche contrôle était significativement prédominante dès J3 et jusqu'à la fin du protocole. Ainsi, ces seconds résultats suggèrent qu'une surexpression d'*ern0160* pourrait également être délétère pour la bactérie, affectant ses capacités

de colonisation intestinale. L'ensemble de ces résultats semble en faveur de l'hypothèse selon laquelle Ern0160 serait impliqué dans la colonisation intestinale, avec probablement une régulation très fine de son expression. La construction d'une souche *cis*-complémentée, avec un niveau d'expression d'*ern0160* proche de celui observé chez la souche sauvage permettrait de confirmer les résultats obtenus avec la souche délétée. Les résultats obtenus lors de ce travail, associés à ceux réalisés par Sinel *et al.* et Dejoies *et al.*, suggèrent un effet pléiotropique d'Ern0160. Par la suite, il sera important de déterminer quelle(s) cible(s) est (sont) régulée(s) par Ern0160 pour comprendre précisément les mécanismes moléculaires.

5. Article

La mise au point du modèle de colonisation intestinale ainsi que l'étude d'Ern0160 ont fait l'objet d'un article scientifique soumis au journal *Frontiers in Microbiology*.

The regulatory RNA *ern0160* confers a potential selective advantage to *Enterococcus faecium* for intestinal colonization

Running title: Role of *ern0160* in *E. faecium*

Sophie Reissier¹, Killian Le Neindre^{1,2}, Valérie Bordeau¹, Loren Dejoies^{1,2}, Audrey Lebot^{1,3}, Brice Felden^{1†}, Vincent Cattoir^{1,2*}, Matthieu Revest^{1,3*}

¹ Université de Rennes 1, Unité Inserm U1230, Rennes, France

² Service de Bactériologie-Hygiène Hospitalière & CNR de la Résistance aux Antibiotiques (laboratoire associé ‘Entérocoques’), CHU de Rennes, Rennes, France

³ Service de Maladies Infectieuses et Réanimation Médicale, CHU de Rennes, Rennes, France

† Deceased author

* Correspondence: matthieu.revest@chu-rennes.fr or vincent.cattoir@univ-rennes1.fr.

Keywords: *E. faecium*, VRE, sRNA, pathogenicity, animal model, gut colonization.

Word count: Abstract = 263 words; Text = 4,087 words; 1 Table; 5 Figures; 32 References; 1 Supplemental material.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the role of the regulatory small RNA (sRNA) Ern0160 in gastrointestinal tract (GIT) colonization by *Enterococcus faecium*. For this purpose, four strains of *E. faecium* were used, Aus0004 (WT), an *ern0160*-deleted Aus0004 mutant (Δ 0160), a *trans*-complemented Δ 0160 strain overexpressing *ern0160* (Δ 0160_0160), and a strain Δ 0160 with an empty pAT29 vector (Δ 0160_pAT29). Strains were studied both *in vitro* and *in vivo*, alone and in competitive assays. In *in vitro* experiments, no difference was observed between WT and Δ 0160 strains cultured single while Δ 0160_0160 strain grew more slowly than Δ 0160_pAT29. In competitive assays, the WT strain was predominant compared to the deleted strain Δ 0160 at the end of the experiment. Then, *in vivo* experiments were performed using a GIT colonization mouse model. Several existing models of GIT colonization were compared while a novel one, combining ceftriaxone and amoxicillin, was developed. A GIT colonization was performed with each strain alone and no significant difference was noticed. By contrast, significant results were obtained with co-colonization experiments. With WT + Δ 0160 suspension, a significant advantage for the WT strain was observed from day 5 to the end of the protocol, suggesting the involvement of *ern0160* in GIT colonization. With Δ 0160_0160 + Δ 0160_pAT29 suspension, the strain with the empty vector took the advantage from day 3 to the end of the protocol, suggesting a deleterious effect of *ern0160* overexpression. Altogether, these findings demonstrate the potential implication of Ern0160 in GIT colonization of *E. faecium*. Further investigations are needed for the identification of sRNA target(s) in order to decipher underlying molecular mechanisms.

INTRODUCTION

Enterococci are ubiquitous Gram-positive cocci that are normal inhabitants of the human gut microbiota. *Enterococcus faecium*, which represents 15 to 25% of enterococcal isolates responsible for human infections, has been increasingly involved in healthcare-associated infections and hospital outbreaks (Goh *et al.*, 2017; Weiner-Lastinger *et al.*, 2020). Glycopeptides are usually used to treat serious *E. faecium* infections, but many clinical isolates have become resistant to vancomycin (VREF) especially in North America. In 2010, up to 80% of VREF were reported in the United States (O'Driscoll and Crank, 2015). According to the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), the mean proportion of VREF among invasive isolates increased from 10.4% to 17.3% in European countries between 2014 and 2018 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2019). These high rates of VREF prevalence could be attributable to the worldwide dissemination of a subpopulation of *E. faecium* hospital-adapted clones that belongs to the clonal complex 17 (CC17) and represents a public health concern (Cattoir and Giard, 2014). This CC17 actually corresponds to the phylogenetic clade A1 composed by the majority of strains responsible for infections and hospital outbreaks. Two other clades also exist, clade A2 that includes animal strains and sporadic human infection isolates and clade B that comprises human commensal fecal strains (Lebreton *et al.*, 2013).

In recent years, bacterial regulatory RNAs, referred as small RNAs (sRNAs), have been described as having a major role in various adaptive responses, including stress response, virulence and antimicrobial resistance (Mraheil *et al.*, 2010; Wagner and Romby, 2015; Klein and Raina, 2017). For example, SprX contributes to vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* (Eyraud *et al.*, 2014) and some sRNAs are involved in stress response in *Enterococcus faecalis* (Michaux *et al.*, 2014). Recently, 61 sRNA candidates were identified in *E. faecium* but there are currently no published data about their function (Sinéel *et al.*, 2017). Among them, 10 have been experimentally validated and their expression under subinhibitory concentrations (SICs) of daptomycin was observed. sRNA_0160 (renamed here Ern0160) appeared to be highly expressed and its expression decreased significantly under daptomycin exposure. Furthermore, *ern0160* is conserved in all studied strains of *E. faecium* belonging to the three different clades (Sinéel *et al.*, 2017). These initial positive results led us to study this sRNA to evaluate its potential role in intestinal colonization

Because the gastrointestinal tract (GIT) serves as a major reservoir from which VREF can spread to the hospital environment and GIT colonization precedes infection, understanding GIT colonization mechanisms appears to be essential to better manage those infections and to limit VREF hospital spread (Donskey *et al.*, 2000, 2001; Ubeda *et al.*, 2010). *In vivo* GIT colonization experimental models with enterococci have been described for a long time, with about one-third of these studies exploring *E. faecium*. Most of them used

mouse models and different antibiotic protocols to eliminate the animal commensal microbiota allowing to the establishment of colonization by the studied bacteria. Several different protocols for GIT colonization with enterococci have been published and there is no consensus on molecules used, routes and durations of administration. For example, in 2009, Heikens *et al.* used a protocol with subcutaneous (SC) ceftriaxone alone, administered for 12 days (Heikens *et al.*, 2009). In 2013, Zhang *et al.* associated SC ceftriaxone two days before inoculation, with cefoxitin added to drinking water (DW) during the protocol (Zhang *et al.*, 2013). Montealegre *et al.* published in 2016 a model of *E. faecium* GIT colonization using a combination of SC clindamycin and gentamicin in DW only 4 days before inoculation (Montealegre *et al.*, 2016). As these protocols are very different, it seemed interesting to compare their performances. Moreover, as VREF intestinal colonization mostly occurs in patients treated with broad-spectrum antibiotics, it seems important to use antibiotics frequently prescribed in clinics, such as third-generation cephalosporins or ampicillin to study the mechanisms of VREF colonization (Dubin and Pamer, 2014).

The aim of this study was to evaluate the role of Ern0160 in *E. faecium* GIT colonization. For this purpose, *in vitro* experiments were performed, and several existing models of GIT colonization were compared while a novel one, as close as possible to human conditions, was developed for *in vivo* studies.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

Data regarding the strain characteristics are summarized in Table 1. The *E. faecium* Aus0004 wild-type (WT) reference strain was used (Lam *et al.*, 2012). This vancomycin-resistant (*vanB*-positive) clinical isolate was recovered from a bacteremic patient and belongs to the CC17. The MIC of amoxicillin for Aus0004 strain was 256 mg/L.

Three mutants were constructed to evaluate the role of *Ern0160* in GIT colonization. As described by Zhang *et al.*, an *ern0160*-deleted *E. faecium* Aus0004 mutant (named $\Delta 0160$) was constructed by allelic exchange with a truncated copy of the gene corresponding to 5'-3' positions of *ern0160* using pWS3 and specific primers (Supplementary Table S1) (Zhang *et al.*, 2011). The *ern0160* gene with its native promoter and rho-independent terminator was cloned into pAT29 shuttle vector using specific primers (Trieu-Cuot *et al.*, 1990). The recombinant plasmid was introduced into *Escherichia coli* EC1000, and then into *E. faecium* $\Delta 0160$ (Leenhouts *et al.*, 1996). The *trans*-complemented strain overexpressing *ern0160* was named $\Delta 0160_{0160}$. A strain $\Delta 0160$ with an empty pAT29 vector was used as control ($\Delta 0160_{pAT29}$). The transformants were selected on media containing 100 mg/L (*E. coli*) or 300 mg/L (*E. faecium*) of spectinomycin.

Bacterial growth curves and competitive assays

Growth curves were performed *in vitro* for each strain, and WT was compared to $\Delta 0160$ while $\Delta 0160_{0160}$ was compared to $\Delta 0160_{pAT29}$. Strains were cultured aerobically overnight on Trypticase-Soy (TS) agar (Thermo Fisher Scientific, Walham, Massachusetts) at $35 \pm 2^\circ\text{C}$. A colony was cultured in 10 mL of Brain-Heart Infusion (BHI) broth (Thermo Fisher Scientific, Walham, Massachusetts) for 18 hours at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ under ambient air. Bacterial cultures were then adjusted to DO_{600} 0.1, and the bacterial growth was evaluated by DO_{600} at each time point (2, 3, 4, 5, 6, 9, and 24 hours). Two competitive assays were also performed, WT *versus* $\Delta 0160$ and $\Delta 0160_{0160}$ *versus* $\Delta 0160_{pAT29}$. Strains were initially mixed at ratio of 1:1 and bacterial growth was measured in the same way as described above. Spectinomycin was added (300 mg/L) to BHI and TS media (BHIspec and TSspec) for all experiments with $\Delta 0160_{pAT29}$ and $\Delta 0160_{0160}$ strains to ensure the maintenance of the plasmid. For competitive assays, a sample of culture was plated on TS and TSspec agar at each point of time, and each strain was identified by PCR, directly from colonies, under standard conditions and using specific primers (Supplementary Table S1). For each time point, 28 colonies were tested, and each experiment was performed independently three times.

Mouse model of GIT colonization

The same strains used for *in vitro* experiments were studied in *in vivo* protocols. For all the experiments, bacterial suspensions were calibrated as follow to inoculate mice with 10^8 cfu/mL. Each strain was grown aerobically overnight on TS agar at $35 \pm 2^\circ\text{C}$. A colony was cultured in 10 mL of BHI broth for 18 hours at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ under ambient air. After centrifugation (15 min, 3500 rpm), the pellet was resuspended in 10 mL of 0.9% saline and centrifuged again. This second pellet was resuspended in 5 mL of 0.9% saline and the inoculum was quantified by serial dilutions plated on TS agar. For co-colonization experiment, a suspension of each strain was prepared as described above, adjusted to the same OD_{600} , and mixed in a 1:1 ratio before being administered to mice. As previously, BHIspec and TSspec were used for all experiments with $\Delta 0160_p\text{AT}29$ and $\Delta 0160_0160$ strains. To ensure mice GIT do not contain any *E. faecium*, an aerobic GIT microbiota study was performed on three cages of five mice. Ten fresh fecal pellets per cage, obtained by light abdominal massage, were suspended in 3 mL of 0.9% NaCl. This suspension was serially diluted and cultured on TS, BHI and Bile-Esculin-Azide (BEA) agar plates (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri) aerobically at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 hours. The different colonies were then quantified and identified by MALDI-TOF mass spectrometry (Microflex, Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts.).

Six-week-old non-inbred female, specific pathogen-free, Swiss mice were purchased (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France). Five animals were housed per cage, with controlled room temperature, a 12-hour light-dark cycle and sterile standard rodent food and water ad libitum. Mice were acclimated for one week prior to the experiment. The experimental protocol was in keeping with French legislation on animal experimentation and approved by the Adaptive Therapeutics Animal Care and Use Committee (reference number: 2018010814547884-APAFIS#13479). To limit the bias induced by the natural murine coprophagia, mice were placed in a new cage on the day of administration of the bacterial suspension.

To compare antibiotic regimens efficacy, mice received antibiotics to decolonize GIT according to the different protocols described below. At day 0, mice were orally inoculated, with the bacterial suspension of *E. faecium* WT. To avoid standard gavage, two days before D0, a "water + chocolate spread" suspension was orally administered with a syringe to mice for them to get used to it. On the day of inoculation, chocolate spread was added to the bacterial suspension at the very last moment, and orally administered to each mouse. GIT colonization was evaluated by quantify *E. faecium* in fresh fecal pellet (one per mouse) obtained by gentle abdominal massage and collected in sterile tubes. Fecal pellets were collected before inoculation (D0) to ensure decolonization, and at day 3, 5, 7, 10 and 14 (Figure 1). Samples were weighted and homogenized in 1 mL of saline solution. Mice were euthanized with CO_2 at D14. Fecal pellets were quantitatively cultured onto TS and BEA agar plates for 18 hours at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ under ambient air, to quantify the aerobic flora and *E. faecium*, respectively. Bacterial loads were expressed in \log_{10} cfu/g of stool or tissue for each sample.

Before *ern0160* study, the *in vivo* plasmid stability was verified by performing the protocol with $\Delta 0160_pAT29$ strain on 5 mice. Fecal pellets were collected at D3 and D10 and plated on agar with and without spectinomycin. The stability was evaluated by the percentage of colony containing pAT29 plasmid, calculated by the ratio $\frac{cfu(TSspec)}{cfu(TS)}$.

For the *ern0160* study, the same protocol was performed with 15 mice per group. Mice received antibiotics before bacterial suspension administration. The suspension contained each strain alone (WT, $\Delta 0160$, $\Delta 0160_0160$ or $\Delta 0160_pAT29$) or a two-strain combination prepared as described above (WT + $\Delta 0160$ or $\Delta 0160_0160$ + $\Delta 0160_pAT29$). A fecal pellet for each animal at D0, D3, D5, D7 and D10 were collected to be quantitatively cultured. Samples collected from mice colonized with WT or $\Delta 0160$ strains or the mixed suspension “WT + $\Delta 0160$ ” were cultured on TS and BEA agar. TS agar and TSspec agar were used to quantify bacterial load in samples collected from mice colonized with $\Delta 0160_0160$ or $\Delta 0160_pAT29$ strains and with the suspension “ $\Delta 0160_0160$ + $\Delta 0160_pAT29$ ”. All agar plates were incubated for 18 hours at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ under ambient air. For co-colonization assay, each strain was identified by PCR, directly from colonies, under standard conditions and using specific primers (Supplementary Table S1). Twelve colonies were tested for each sample.

Antibiotic protocols

Five decolonization regimens were tested. Each protocol was administered to five mice before the inoculation at D0. Protocol A, described by Montealegre *et al.*, combined SC clindamycin (Panpharma S.A., Luitré, France) injected every 12 hours (2.4 mg/day/mouse) for four days and gentamicin (Panpharma) in DW (1 mg/mL) for two days before inoculation (Montealegre *et al.*, 2016). Zhang *et al.* described the protocol B (Zhang *et al.*, 2011), which combined SC ceftriaxone (Mylan, Canonsburg, Pennsylvania) and ceftioxin (Panpharma). Ceftriaxone (2.4 mg/day/mouse) was injected twice a day, two days before inoculation and ceftioxin (0.2 mg/mL) added to DW during the 14 days of the colonization. Protocol C was adapted from Heinkens *et al.* (Heinkens *et al.*, 2009), who used SC ceftriaxone (2.4 mg/day/mouse) two days before inoculation and until the end of the study. In our adapted protocol, SC ceftriaxone was administered (2.4 mg/day/mouse) two days before inoculation and then in DW (0.1 mg/mL) until D14. Protocol D was the same than protocol B (ceftriaxone plus ceftioxin), with amoxicillin (Panpharma) (0.1 mg/mL) added in DW during the two days before inoculation. Finally, protocol E combined SC ceftriaxone (2.4 mg/day/mouse) and amoxicillin in DW (0.1 mg/mL) two days before inoculation, ceftriaxone (0.1 mg/mL) and amoxicillin (0.03 mg/mL) were then put in DW throughout the colonization. All regimens are summarized on Figure 2. One group received no antibiotics as a control group.

Statistical analysis

For competitive and co-colonization assays, competitive index (CI) and normalized competitive index (nCI) were calculated for each time point as follows. CI was the ratio between “ Δ 0160 colonies” and “WT colonies”, or between “ Δ 0160_0160 colonies” and “ Δ 0160_pAT29 colonies”. nCI was calculated by dividing CI by CI calculated at T0 for *in vitro* assay, and D0 (suspension inoculated) for *in vivo* experiments. A normalized competitive index of 1 meant no difference, a normalized competitive index <1 meant that WT or Δ 0160_pAT29 was in higher numbers than Δ 0160 or Δ 0160_0160 respectively, and a competitive index >1 meant that Δ 0160 or Δ 0160_0160 was in higher numbers than WT or Δ 0160_pAT29 respectively. A Shapiro-Wilk test (P value > 0.05) was used to evaluate normality. According to the result, CIs were analyzed using Student’s t test or Wilcoxon signed-rank test, with the null hypothesis: mean CI was not significantly different from 1 (P values of 0.05 used). Between-group cfu counts for fecal pellets were expressed by mean and standard deviation and compared with Mann Whitney test or Student’s t test. Antibiotic protocol results were analyzed using a Kruskal-Wallis test. P <0.05 was considered statistically significant. Data were analysed using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.).

RESULTS

In vitro experiments

Results for all bacterial growth curves are represented in Figure 3(A) and 3(B). No significant difference was observed between WT and Δ 0160 growth curves. The maximum DO₆₀₀ was similar and achieved simultaneously. Conversely, Δ 0160_0160 and Δ 0160_pAT29 showed a different growth rate. A difference of approximately two hours to reach the growth plateau was observed between the two strains, Δ 0160_0160 grew more slowly than Δ 0160_pAT29. Moreover, the maximum DO₆₀₀ was lower for Δ 0160_0160 bacterial growth.

According to these results, only the WT and Δ 0160 strains were studied in competitive assays. Competitive assay has been conducted during 24 hours with PCR on 28 different colonies performed at each point of time. Results are reported on Figure 3(C) and 3(D). Up to 9 hours of culture, the nCI was not significantly different from 1, which means that the two strains were growing in a similar way. At T24, the mean nCI was 0.57 and significantly lower than 1 ($p=0.02$), meaning that the WT strain was predominant compared to the deleted strain Δ 0160.

In vivo experiments

Experimental model development

Each protocol was tested on five mice, colonized with the *E. faecium* WT suspension for 14 days. Prior to begin our experiments, normal aerobic GIT microbiota of Swiss mice was determined on five mice. It was composed of lactobacilli (85.2%), Enterobacterales (8.5%) and *E. faecalis* (6.3%). For each experiment, mice were screened for *E. faecium* before colonization (D0) and no stool samples contained any.

Results are shown in Figure 4. In the control group, which received no antibiotic prior to WT suspension administration, no VREF were isolated from fecal pellets at D3, 5, 7, 10 and 14. With protocol A (gentamicin + clindamycin), fecal pellets contained a mean of 3.34×10^9 cfu/g at D3, 4.24×10^8 cfu/g at D5, and 3.00×10^7 cfu/g at D7. No VREF were found between D10 and D14. Whereas there were no *E. faecalis* at D0, they were gradually detected from D7 to D14 (3.08×10^4 cfu/g at D14). With protocols B (ceftriaxone + ceftiofloxacin), C (ceftriaxone alone), D (ceftriaxone + ceftiofloxacin + amoxicillin) and E (ceftriaxone + amoxicillin) a high and stable colonization was observed. Between D3 and D14, fecal pellets from mice treated with protocols B and C contained a mean of 8.86×10^9 cfu/g and 5.50×10^9 cfu/g respectively. Some *E. faecalis* were detected at the end of colonization but they remained a minority compared to VREF. The mean VREF bacterial load in fecal pellets from animals receiving protocols D and E antibiotics were 8.89×10^9 cfu/g and 6.69×10^9 cfu/g respectively. No contamination by *E. faecalis* was observed with protocol E. Regarding VREF colonization, no significant difference was observed between protocols B, C, D and E ($p=0.6$).

Ern0160 study

To study *in vivo* the role of Ern0160 in GIT colonization, the model with protocol E (ceftriaxone plus amoxicilline) was applied during 10 days, with each strain alone in a first step (WT, Δ 0160, Δ 0160_0160 or Δ 0160_pAT29) and with a combination of two in a second step (WT + Δ 0160 and Δ 0160_0160 + Δ 0160_pAT29). Each group was composed of 15 mice. The *in vivo* stability was first evaluated by determining the percentage of colony that retained pAT29 plasmid. At D3, 94% of colonies retained the plasmid and 75% at D10, which is consistent with studies previously published (Deol *et al.*, 2007).

Results obtained with GIT colonization with single strains are shown in Figure 5(A) and 5(B). At D3, the mean bacterial load was significantly higher with WT strain compared to Δ 0160 (5.2×10^9 cfu/g and 2.8×10^9 cfu/g respectively, $p=0.008$). Then, from D5 to D10, GIT colonization remained high and stable with WT and Δ 0160 strains, with a mean bacterial load of 5.78×10^9 cfu/g and 6.03×10^9 cfu/g respectively, which was not significantly different (Figure 5A). A high and stable GIT colonization was also obtained from D3 with mutant strains Δ 0160_0160 and Δ 0160_pAT29. At D3, the mean bacterial load was 1.49×10^9 cfu/g and 1.61×10^9 cfu/g with Δ 0160_0160 and Δ 0160_pAT29 respectively, which was not significantly different. From D5 to D10, GIT colonization remained stably high with Δ 0160_0160 and

$\Delta 0160_pAT29$ strains, with a mean bacterial load of 5.93×10^9 cfu/g and 1.70×10^9 cfu/g respectively, which was not significantly different (Figure 5B)

Co-colonization model was performed with the two combinations of strains. With WT + $\Delta 0160$ suspension, the nCI was not significantly different from 1 at D3, the two strains colonized GIT in the same way. From D5 to D10, nCI significantly decreased ($p= 0.01$ at D5, and $p < 0.01$ at D7 and D10) with a predominance of the WT strain (Figure 5C and 5D). With $\Delta 0160_0160 + \Delta 0160_pAT29$ suspension, an nCI under 0.1 was observed from D3 to the end of the protocol for all mice. At D10, all colonies tested belonged to $\Delta 0160_pAT29$ strain and no $\Delta 0160_0160$ colony was isolated.

DISCUSSION

In the last decade, bacterial sRNAs have been more and more investigated and even if functions of many of these riboregulators are still unknown, several of them are involved in stress response or virulence. Few data are available on sRNAs in *E. faecium*; indeed they have been identified only recently (Siné et al., 2017). In their study, Siné et al. showed that the expression level of one sRNA, Ern0160, was significantly downregulated under SICs daptomycin exposure. More recently, Dejoies et al. described a significant reduction of *ern0160* expression level under SICs of biocides (Dejoies et al., 2021). These two studies suggest that Ern0160 could be involved in antibiotic and biocide stress responses in *E. faecium* and for these reasons; it appeared to be an interesting candidate potentially involved in its pathogenicity. GIT colonization is the main starting point of VREF infection and hospital outbreaks. Colonization mechanisms remain unclear, so this study sought to highlight whether Ern0160 could be implicated.

GIT colonization studies are difficult to reproduce *in vitro* because many parameters are involved, such as pH, cell diversity, or enzymatic activity. Experimental models have been developed to study enterococci infectious diseases since 1899 (Maccallum and Hastings, 1899). These models enabled researchers to study enterococcal pathogenesis in the context of the innate and adaptive immune responses, as closely as possible to human conditions. Moreover, experimental models are reproducible and reliable statistical analysis on data could be done. Mice are the most frequently used animal to study enterococci in GIT (Goh et al., 2017). In our study, we evaluated for the first time sRNA of *E. faecium* in a GIT colonization model optimized for this purpose. Several models of GIT colonization have been published, based on administration of a suspension of enterococci *via* oral gavage or in the drinking water. Oral gavage is an invasive procedure that can damage the esophagus, but a calibrated quantity of bacteria could be administered. Because mice are housed by five, if the bacterial suspension is administered in the drinking water, the number of bacteria taken up by each mouse is not precisely quantifiable. Because of these disadvantages, an alternative method has been chosen for our study (Scarborough et al., 2020). A “water+chocolate spread” solution was orally

administered to mice a few days before starting colonization and then added to bacterial suspension. Thus, a calibrated suspension of bacteria could be administered without invasive procedure and thus avoid the possible associated complications. Prior to inoculation, mice received antibiotics to eliminate GIT normal flora. Several antibiotic regimens have been published and compared in our study. All tested protocols led to an important colonization but had some limitations. With the one associating clindamycin and gentamicin, the VREF colonization did not persist long enough and with protocols composed of β -lactams without amoxicillin, a significant growth of *E. faecalis* was observed. A high and stable colonization without *E. faecalis* contamination was obtained with two regimens, ceftriaxone associated with amoxicillin and ceftriaxone associated with amoxicillin and cefoxitin. As cefoxitin is not frequently used in human medicine unlike ceftriaxone, the protocol without cefoxitin was preferred, to be as close as possible to human conditions.

In our *in vitro* experiments, the deleted mutant strain Δ 0160 grew like the wild type strain. These results have been confirmed in *in vivo* experiments. Indeed, a similar colonization profile was obtained with the two strains tested individually. Competitive assays have also been performed *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, neither of the two strains grew more than the other up to 24 hours of culture. At 24 hours, the wild type strain was slightly predominant. As *in vitro* experiments were performed in BHI broth, which is far from the composition of the digestive tract, it was important to perform competition assays in mice. In co-colonization model, the wild-type strain was significantly predominant from day 3 until the end of the protocol. These results suggested that Ern0160 could be involved in GIT colonization process. To complete the results obtained with the deleted strain, identical *in vitro* and *in vivo* experiments were performed with the *trans*-complemented strain Δ 0160_0160, which overexpressed *ern0160*, knowing that overexpression experiments are classically used to study sRNA functions (Brantl and Jahn, 2015). The strain Δ 0160_pAT29, with an empty pAT29 vector was used as control to compare strains with supposed similar fitness costs. In individual bacterial growth curve assays, Δ 0160_0160 strain appeared to grow more slowly than Δ 0160_pAT29 strain. The overexpression of *ern0160* by the strain Δ 0160_0160 may induce an energetic cost for the bacterium and could therefore explain the shift observed in growth kinetics. In colonization model with only a strain, the two strains colonized mice in the same way during all protocol. In co-colonization model, Δ 0160_pAT29 strain was largely predominant by day 3 and until the end of the protocol. Based on our first results, it would have been expected that the complemented strain Δ 0160_0160 would colonize GIT more than Δ 0160_pAT29 strain. As Δ 0160_0160 strain overexpressed *ern0160* compared to WT strain, these results suggested that an overexpression of *ern0160* could be deleterious to the strain in GIT colonization. Altogether, these findings show the involvement of Ern0160 in GIT colonization with a probable very tight regulation. Further studies, in particular with a *cis*-complemented strain, may provide additional information. As Ern0160 has probably pleiotropic effects, it will also be

important to determine which target(s) are regulated by Ern0160 to understand precisely molecular mechanisms. As the different pathways of adaptation or virulence often involve several RNAs, it will also be interesting to determine if other sRNAs are involved in GIT colonization and if there is a cross-regulation with Ern0160. This study was the first to explore *in vivo* *E. faecium* regulatory RNAs and its potential function in GIT colonization. Further studies are needed to determine the targets of this sRNA in order to decipher its role and regulatory circuits.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SR, BF, VC and MR conceived and designed the experiments; SR, KLN, VB, LD and AL performed the experiments; SR, BF, VC and MR analyzed the data; VB, BF, VC and MR contributed with reagents/materials/analysis tools; SR, BF, VC and MR wrote the manuscript. All the authors discussed the results and commented on the manuscript.

FUNDING

This work was supported by the “Fondation pour la Recherche Médicale” [to S.R., grant number FDM 20170637920], the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” and Rennes 1 University.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Biosit Arche platform (Rennes 1 University, France), for animal house facilities.

REFERENCES

- Brantl, S., and Jahn, N. (2015). sRNAs in bacterial type I and type III toxin-antitoxin systems. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 413–427. doi:10.1093/femsre/fuv003.
- Cattoir, V., and Giard, J.-C. (2014). Antibiotic resistance in *Enterococcus faecium* clinical isolates. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 12, 239–248. doi:10.1586/14787210.2014.870886.
- Dejoies, L., Le Neindre, K., Reissier, S., Felden, B., and Cattoir, V. (2021). Distinct expression profiles of regulatory RNAs in the response to biocides in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium*. *Sci. Rep.* 11, 6892. doi:10.1038/s41598-021-86376-y.
- Deol, P., Zaiss, D. M. W., Monaco, J. J., and Sijts, A. J. A. M. (2007). Rates of processing determine the immunogenicity of immunoproteasome-generated epitopes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 7557–7562. doi:10.4049/jimmunol.178.12.7557.
- Donskey, C. J., Hanrahan, J. A., Hutton, R. A., and Rice, L. B. (2000). Effect of Parenteral Antibiotic Administration on the Establishment of Colonization with Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* in the Mouse Gastrointestinal Tract. *J. Infect. Dis.* 181, 1830–1833. doi:10.1086/315428.
- Donskey, C. J., Huyen, C. K., Das, S. M., Farmer, S., Dery, M., and Bonomo, R. A. (2001). Effect of oral *Bacillus coagulans* administration on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized mice. *Let. Appl. Microbiol.* 33, 84–88. doi:10.1046/j.1472-765X.2001.00948.x.
- Dubin, K., and Pamer, E. G. (2014). Enterococci and their interactions with the intestinal microbiome. *Microbiol. Spectr.* 5. doi:10.1128/microbiolspec.BAD-0014-2016.
- European Centre for Disease Prevention and Control (2019). Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. 110.
- Eyraud, A., Tattevin, P., Chabelskaya, S., and Felden, B. (2014). A small RNA controls a protein regulator involved in antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* 42, 4892–4905. doi:10.1093/nar/gku149.
- Goh, H. M. S., Yong, M. H. A., Chong, K. K. L., and Kline, K. A. (2017). Model systems for the study of Enterococcal colonization and infection. *Virulence* 8, 1525–1562. doi:10.1080/21505594.2017.1279766.
- Heikens, E., Leendertse, M., Wijnands, L. M., Luit-Asbroek, M. van, Bonten, M. J., Poll, T. van der, *et al.* (2009). Enterococcal surface protein Esp is not essential for cell adhesion and intestinal colonization of *Enterococcus faecium* in mice. *BMC Microbiol.* 9, 19. doi:10.1186/1471-2180-9-19.
- Klein, G., and Raina, S. (2017). Small regulatory bacterial RNAs regulating the envelope stress response. *Biochem. Soc. Trans.* 45, 417–425. doi:10.1042/BST20160367.
- Lam, M. M. C., Seemann, T., Bulach, D. M., Gladman, S. L., Chen, H., Haring, V., *et al.* (2012a). Comparative analysis of the first complete *Enterococcus faecium* genome. *J. Bacteriol.* 194, 2334–2341. doi:10.1128/JB.00259-12.
- Lebreton, F., van Schaik, W., McGuire, A. M., Godfrey, P., Griggs, A., Mazumdar, V., *et al.* (2013). Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. *mBio* 4. doi:10.1128/mBio.00534-13.

- Leenhouts, K., Buist, G., Bolhuis, A., ten Berge, A., Kiel, J., Mierau, I., *et al.* (1996). A general system for generating unlabelled gene replacements in bacterial chromosomes. *Mol. Gen. Genet. MGG* 253, 217–224. doi:10.1007/s004380050315.
- Maccallum, W. G., and 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, 521–534.
- Michaux, C., Hartke, A., Martini, C., Reiss, S., Albrecht, D., Budin-Verneuil, A., *et al.* (2014). Involvement of *Enterococcus faecalis* Small RNAs in Stress Response and Virulence. *Infect. Immun.* 82, 3599–3611. doi:10.1128/IAI.01900-14.
- Montealegre, M. C., Singh, K. V., and Murray, B. E. (2016). Gastrointestinal Tract Colonization Dynamics by Different *Enterococcus faecium* Clades. *J. Infect. Dis.* 213, 1914–1922. doi:10.1093/infdis/jiv597.
- Mraheil, M. A., Billion, A., Kuenne, C., Pischmarov, J., Kreikemeyer, B., Engelmann, S., *et al.* (2010). Comparative genome-wide analysis of small RNAs of major Gram-positive pathogens: from identification to application. *Microb. Biotechnol.* 3, 658–676. doi:10.1111/j.1751-7915.2010.00171.x.
- O’Driscoll, T., and Crank, C. W. (2015). Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect. Drug Resist.* 8, 217–230. doi:10.2147/IDR.S54125.
- Scarborough, J., Mueller, F., Arban, R., Dorner-Ciossek, C., Weber-Stadlbauer, U., Rosenbrock, H., *et al.* (2020). Preclinical validation of the micropipette-guided drug administration (MDA) method in the maternal immune activation model of neurodevelopmental disorders. *Brain. Behav. Immun.* 88, 461–470. doi:10.1016/j.bbi.2020.04.015.
- Sinel, C., Augagneur, Y., Sassi, M., Bronsard, J., Cacaci, M., Guérin, F., *et al.* (2017). Small RNAs in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* involved in daptomycin response and resistance. *Sci. Rep.* 7. doi:10.1038/s41598-017-11265-2.
- Trieu-Cuot, P., Carlier, C., Poyart-Salmeron, C., and Courvalin, P. (1990). A pair of mobilizable shuttle vectors conferring resistance to spectinomycin for molecular cloning in *Escherichia coli* and in gram-positive bacteria. *Nucleic Acids Res.* 18, 4296. doi:10.1093/nar/18.14.4296.
- Ubeda, C., Taur, Y., Jenq, R. R., Equinda, M. J., Son, T., Samstein, M., *et al.* (2010). Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J. Clin. Invest.* 120, 4332–4341. doi:10.1172/JCI43918.
- Wagner, E. G. H., and Romby, P. (2015). “Chapter Three - Small RNAs in Bacteria and Archaea: Who They Are, What They Do, and How They Do It,” in *Advances in Genetics*, eds. T. Friedmann, J. C. Dunlap, and S. F. Goodwin (Academic Press), 133–208. doi:10.1016/bs.adgen.2015.05.001.
- Weiner-Lasting, L. M., Abner, S., Edwards, J. R., Kallen, A. J., Karlsson, M., Magill, S. S., *et al.* (2020). Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015–2017. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 41, 1–18. doi:10.1017/ice.2019.296.

Zhang, X., Top, J., de Been, M., Bierschenk, D., Rogers, M., Leendertse, M., *et al.* (2013). Identification of a genetic determinant in clinical *Enterococcus faecium* strains that contributes to intestinal colonization during antibiotic treatment. *J. Infect. Dis.* 207, 1780–1786. doi:10.1093/infdis/jit076.

Zhang, X., Vrijenhoek, J. E. P., Bonten, M. J. M., Willems, R. J. L., and van Schaik, W. (2011). A genetic element present on megaplasms allows *Enterococcus faecium* to use raffinose as carbon source. *Environ. Microbiol.* 13, 518–528. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02355.x.

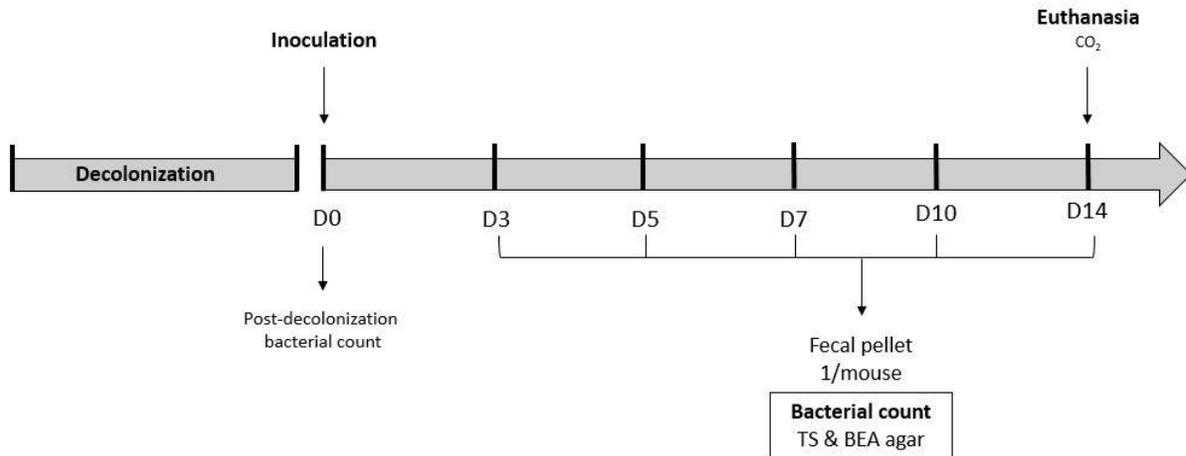


Figure 1

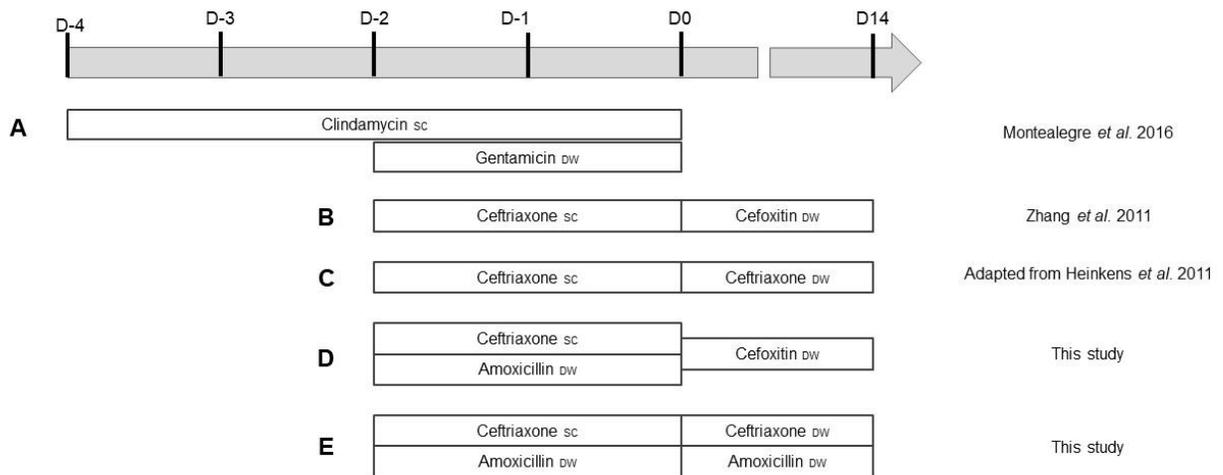


Figure 2

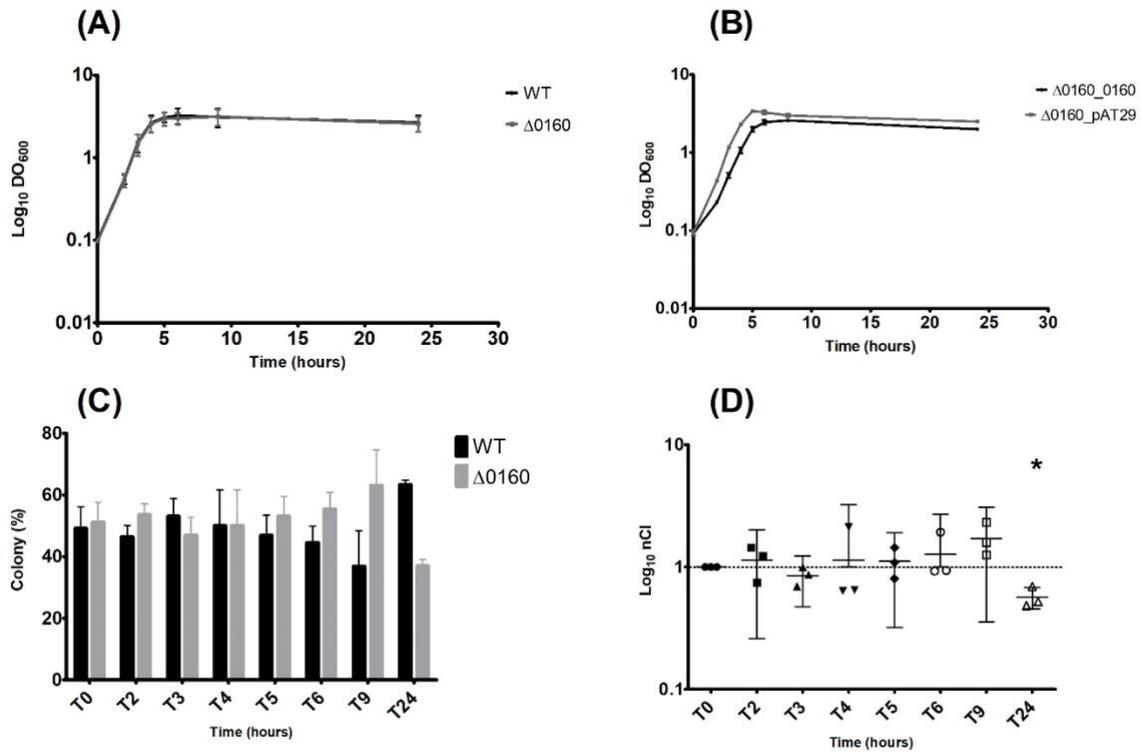


Figure 3

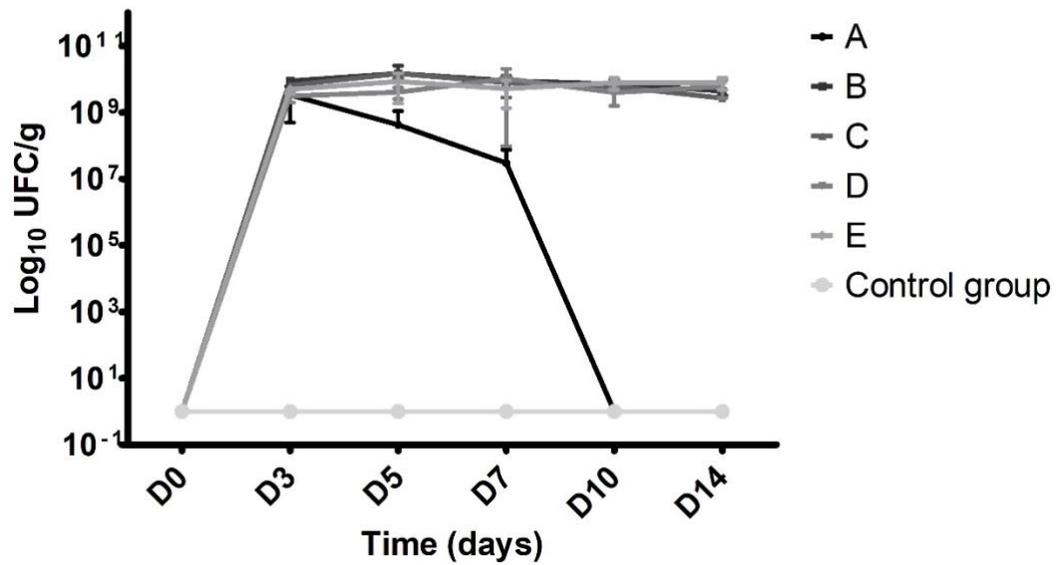


Figure 4

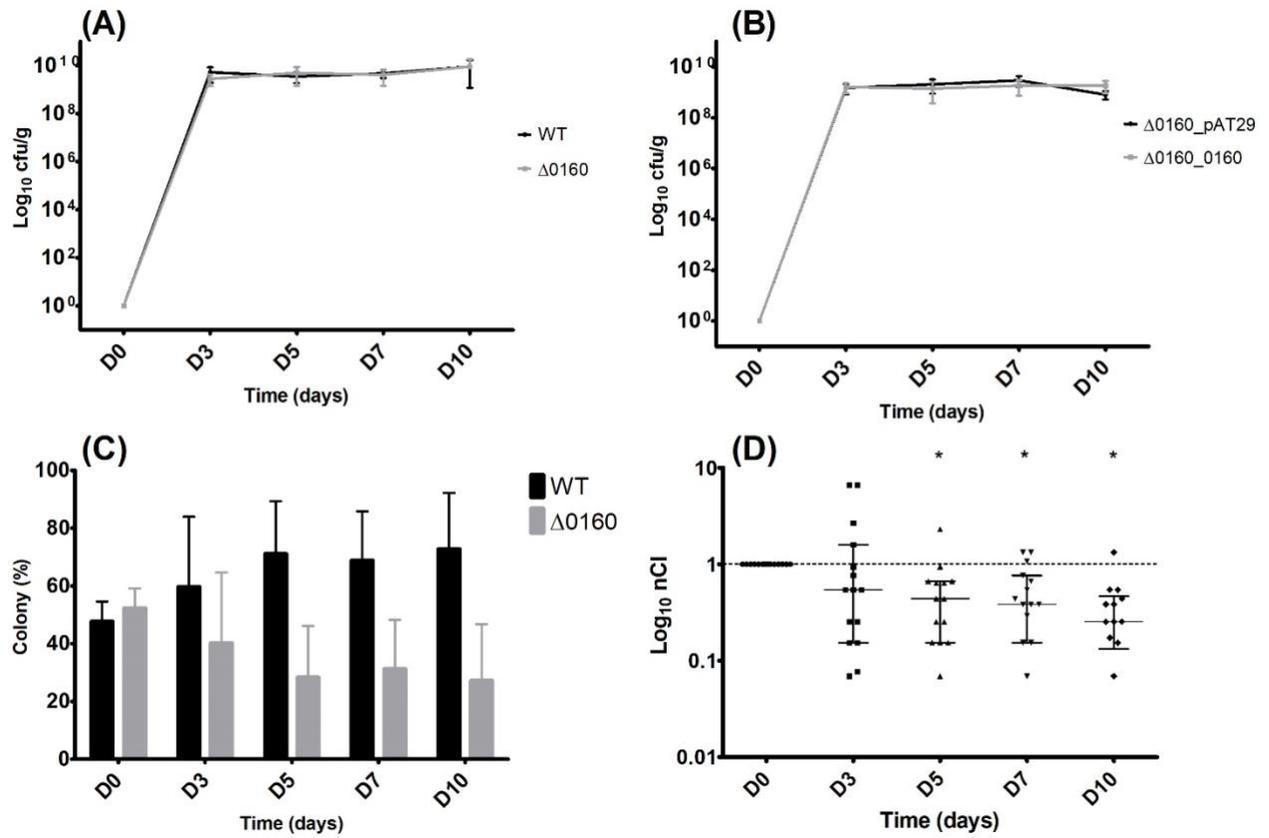


Figure 5

LEGENDS OF THE FIGURES

Figure 1 | GIT colonization model used to compare antibiotic regimens.

Figure 2 | Antibiotic administration according protocols. D0 corresponds to the day of bacterial suspension inoculation. SC: subcutaneous, and DW: drinking water.

Figure 3 | *In vitro* experiments. (A), Bacterial growth curves of WT and Δ 0160 strains growth individually in BHI broth. (B), Bacterial growth curves of Δ 0160_0160 and Δ 0160_pAT29 strains growth individually in BHI broth supplemented with spectinomycin. Each mean value in (A) and (B) represents the mean DO₆₀₀ generated from three replicates, error bars represent standard error. (C), Competitive assay of WT *versus* Δ 0160 strains. The proportion of colonies of each strain identified was determined by PCR colony. Each mean value represents the mean colony proportion from three replicates (28 PCR at each time point for each replicate), error bars represent standard error. (D), Competitive assay of WT *versus* Δ 0160 strains, normalized competitive index (nCI) values of each replicate represented with means and 95% confidence interval. Asterisk indicates which results have been shown by statistical analysis to be different from 1.

Figure 4 | VREF Bacterial load in fecal pellets according antibiotic regimen and time. Each point represents the mean value of cfu values per gram obtained from five mice. A: clindamycin SC + gentamicine DW, B: ceftriaxone SC + ceftiofloxacin DW, C: ceftriaxone SC + DW, D, ceftriaxone SC + amoxicillin DW + ceftiofloxacin DW, E: ceftriaxone + amoxicillin SC and DW (SC: subcutaneous, DW: drinking water).

Figure 5 | GIT colonization with each strain individually and co-colonization with WT and Δ 0160 strains mixed. (A) Mean bacterial load per gram in fecal pellets from 15 mice inoculated with WT strain, and 15 mice with Δ 0160 strain. (B) Mean bacterial load per gram in fecal pellets from mice inoculated with mutant strains Δ 0160_0160 and Δ 0160_pAT29. Error bars represent standard deviation. (C) Proportion of colonies of each strain identified by PCR colony. Each mean value represents the mean colony proportion from 15 mice (12 PCR at each time point for each sample). (D) Normalized competitive index (nCI) values calculated for each mouse represented with means and 95% confidence interval. Asterisk indicates which results have been shown by statistical analysis to be different from 1.

Table 1 | Bacterial strains and plasmids used in the study.

Strains or plasmids	Relevant characteristics	Reference
Strains		
<i>E. faecium</i>		
Aus0004 WT	<i>vanB</i> -positive <i>E. faecium</i> Aus0004 reference strain	(Lam <i>et al.</i> , 2012)
Δ0160	<i>ern0160</i> -deleted Aus0004	This study
Δ0160_pAT29	Δ0160 carrying empty pAT29 vector	This study
Δ0160_Δ0160	Δ0160 carrying recombinant plasmid pAT29Ω0160	This study
<i>E. coli</i>		
EC1000	Strain using for cloning	(Leenhouts <i>et al.</i> , 1996)
Plasmids		
pWS3	Temperature-sensitive pG(+)/host9-derived shuttle vector used for gene disruption (Spc ^r)	(Zhang <i>et al.</i> , 2011)
pAT29	High-copy-number shuttle vector used for cloning (Spc ^r)	(Trieu-Cuot <i>et al.</i> , 1990b)
pAT29Ω <i>ern0160</i>	Recombinant pAT29 plasmid containing <i>ern0160</i> with its native promoter and rho-independent terminator (Spc ^r)	This study

Spc^r : spectinomycin resistance.

Supplementary Table S1 | Oligonucleotides used in the study.

Name	Nucleotide sequence (5'-3')	Gene and purpose
KOsrn0160 F1	TTGACCCGGGCTATCTGACACTACATGTAG	<i>srn0160</i> deletion and verification
KOsrn0160F2	CTCTCGATAAGCTCGATCTATATAATAGCATCCTTTG	
KOsrn0160R1	CGAGCTTATCGAGAGCTCGGCTTTTTC	
KOsrn0160R2	ACACCCGGGGTTTGTATTTCATATCTTGC	
KOsrn0160VF	GTGCTTATATTTGCAAACGCTACCAAAGG	
KOsrn0160VR	GGAGATGCGATGTTTCGTGAAATAAGG	
pCsrn0160F2	GGTGGTGGATCCGGTTATGAAAAGCCGCTAG	
pCsrn0160R2	GGTGGTGAATTCCTATTCCTCCTTTAAAATCTTCGTAC	
pWS3F1	TTTCCAGTCACGACGTTGT	Plasmid verification
pWS3R1	ACTGACAGCTTCCAAGGAGC	
pAT29vF	GTAAAACGACGGCCAG	
pAT29vR	CAGGAAACAGCTATGAC	

BIOLOGIE MOLECULAIRE

L'étude de Sinel *et al.* a montré qu'il existait un nombre important d'ARN régulateurs (Ern) potentiels chez *E. faecium* [81]. Cette étude a servi de point de départ à notre travail qui consistait à caractériser ces sARN. Leur expression était quantifiée et leurs coordonnées déterminées avec plus de précision, en vue de créer des souches mutantes délétées des Ern considérés, afin de pouvoir explorer leur rôle d'un point de vue phénotypique.

1. Sélection des sARN étudiés

Les Ern putatifs à étudier en priorité ont été sélectionnés en fonction de leur prévalence au sein des différents clades. Ainsi, nous avons privilégié les Ern retrouvés dans les souches des clades A1 et A2 regroupant une majorité de souches pathogènes [81]. Les Ern sélectionnés étaient Ern0560, Ern0980 et Ern2020 (Figure 34). Le Tableau 3 reprend les données décrites pour ces sARN.

Tableau 3. Coordonnées et niveau d'expression des Ern sélectionnés.

(d'après Sinel *et al.*, 2017) [81]

ARN	Brin	Coordonnées prédites		Taille prédite	Expression transcriptomique normalisée
		5'	3'		
Ern0560	-	524527	524176	352	69
Ern0980	-	1081114	1080881	234	286
Ern2020	+	2497479	2497545	67	167

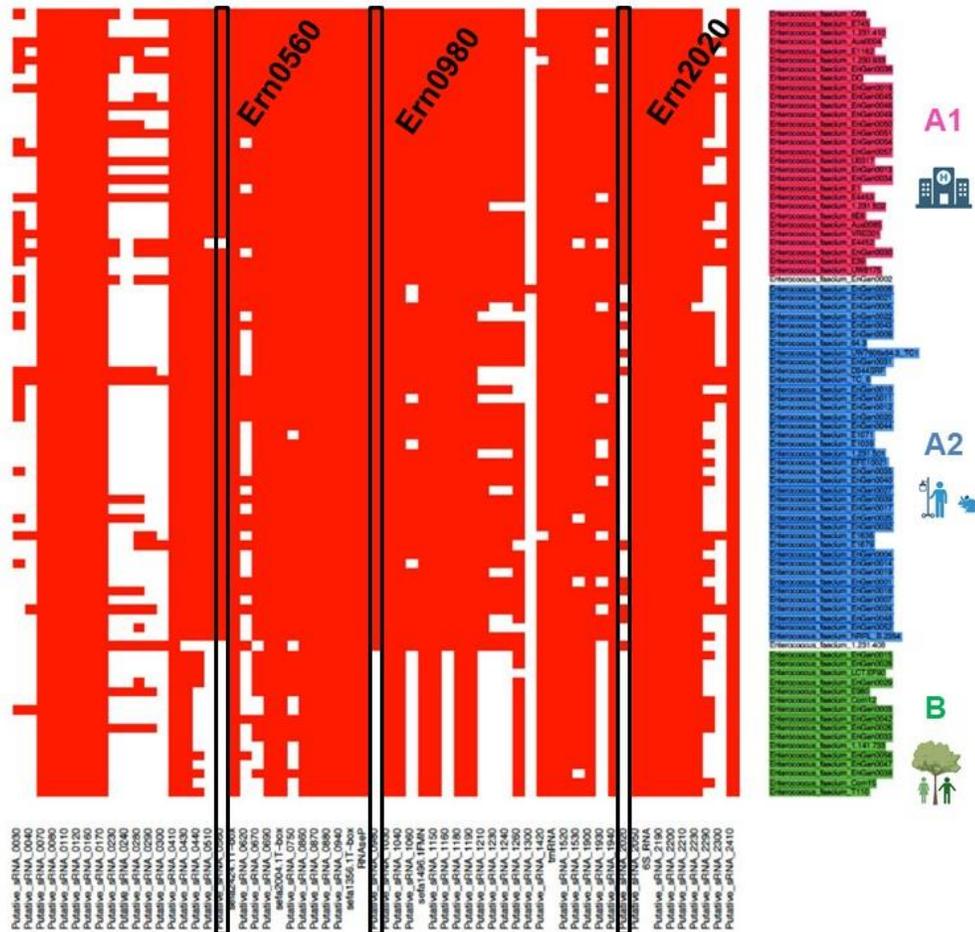


Figure 34. Ern sélectionnés d'après l'étude de Sinel *et al.*, 2017 [81]

2. Matériels et Méthodes

Plusieurs techniques ont été utilisées pour caractériser ces Ern.

- Évaluation de l'environnement génétique

Les coordonnées des Ern décrites par Sinel *et al.* ont permis de visualiser les Ern à l'aide du logiciel d'exploration et d'annotation de génome Artémis® (Wellcome Trust Sanger Institute) et ainsi d'évaluer leur environnement génétique.

- Évaluation de l'expression

L'expression des Ern a été évaluée par RT-qPCR (protocole « one step ») ou Northern-Blot (détection de l'ARN à l'aide d'une sonde radio marquée) [154,156]. Les deux techniques ont été réalisés sur des extraits d'ARN obtenus à partir de la souche de référence *d'E. faecium* Aus0004 [139], à trois temps de croissance (milieu de phase exponentielle [ME], fin de phase exponentielle [LE] et phase stationnaire [ES]) Le protocole de RT-qPCR a été réalisé en triplicat et les résultats exprimés en nombre de copies pour 50 ng d'ARN.

- Détermination des extrémités 5' et 3'

Les extrémités 5' et 3' des Ern ont été déterminées par une technique de 5'3' RACE mapping [156]. Cette technique repose sur la circularisation des ARN. Une fois l'ARN circularisé, les extrémités sont positionnées au niveau du site de jonction. L'amplification de la région contenant ce site de jonction permet de déterminer les extrémités par séquençage. Cette technique a été réalisée à partir d'ARN extraits obtenus à partir de la souche de référence Aus0004.

3. Ern0560

L'Ern0560 était retrouvé uniquement dans les souches des clades A1 et A2. Il était faiblement exprimé (Figure 34 et Tableau 3). La quantification de son expression a été réalisée uniquement par RT-qPCR. Les résultats sont représentés sur la Figure 35B. Les extrémités 5' et 3' ont été déterminées avec succès et sont présentées dans le Tableau 4. L'environnement génétique a ensuite pu être déterminé (Figure 35A).

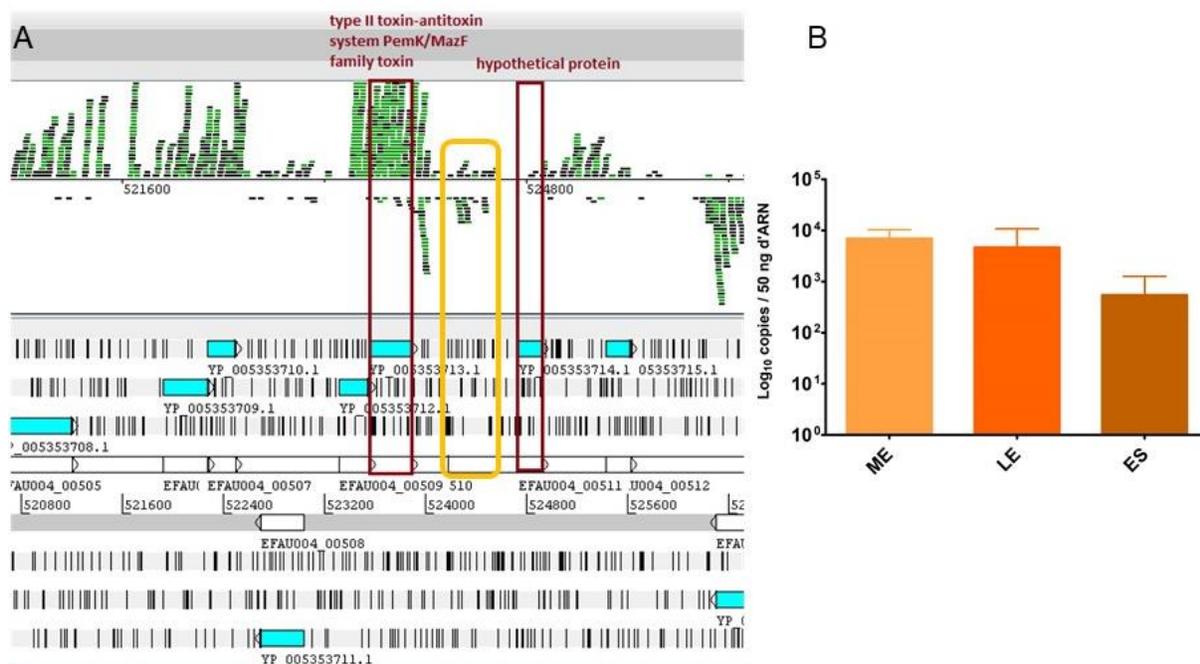


Figure 35. Résultats obtenus pour Ern0560.

- (A) Visualisation de l'environnement génétique après détermination des coordonnées 5'et 3'.
 (B) Quantification par qRT-PCR. Les barres d'erreur représentent l'écart-type

Tableau 4. Coordonnées et taille des Ern sélectionnés déterminées par 5'3' RACE mapping.

ARN	Coordonnées prédites <i>Sinel et al.</i>		Taille prédite <i>Sinel et al.</i>	Coordonnées RACE		Taille RACE
	5'	3'		5'	3'	
Ern0560	524527	524176	352	524180	524682	502
Ern0980	1081114	1080881	234	1080848	1081141	293
Ern2020	2497479	2497545	67	-	-	-

4. Ern0980

L'Ern0980 était également absent du clade B. La quantification de son expression a été réalisée par les deux techniques. Seuls les résultats du Northern-Blot sont présentés ici. Les résultats de RT-qPCR n'étaient pas reproductibles et donc difficilement interprétables. Ern0980 semble exprimé en phase exponentielle de la croissance bactérienne. En phase stationnaire, son

expression est inférieure à la limite de détection par Northern-Blot (Figure 36B). Comme pour Ern0560, les coordonnées d'Ern0980 ont pu être déterminées avec précision, et un aperçu de son environnement génétique a été modélisé sur le logiciel Artemis® (Tableau 4 et Figure 36A).

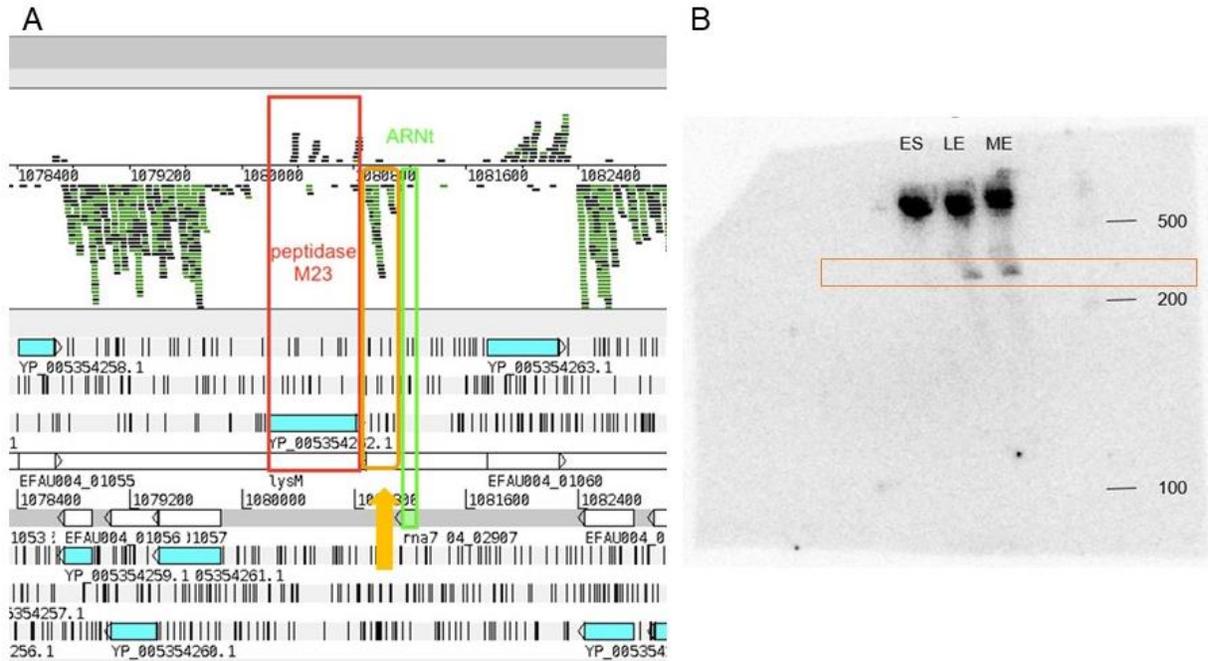


Figure 36. Résultats obtenus pour Ern0980

- (A) Visualisation de l'environnement génétique après détermination des coordonnées 5'et 3'.
 (B) Quantification par Northern-Blot, le rectangle orange correspond à Ern0980.

5. Ern2020

L'Ern2020 était présent presque exclusivement chez les souches appartenant au clade A1, souches pathogènes majoritairement retrouvées dans l'environnement hospitalier. Les résultats obtenus pour Ern2020 sont représentés sur la Figure 37. De même que pour Ern0980, l'expression de Ern2020 était non visible en Northern-Blot pour les extraits obtenus en phase stationnaire. En revanche le signal était plus important au stade précoce de la croissance. La petite taille de ce sARN prédite par Sinel *et al.* et la grande homologie avec d'autres séquences,

n'ont pas permis de concevoir les amorces spécifiques nécessaires à la réalisation des expérimentations de 5'3' RACE mapping.

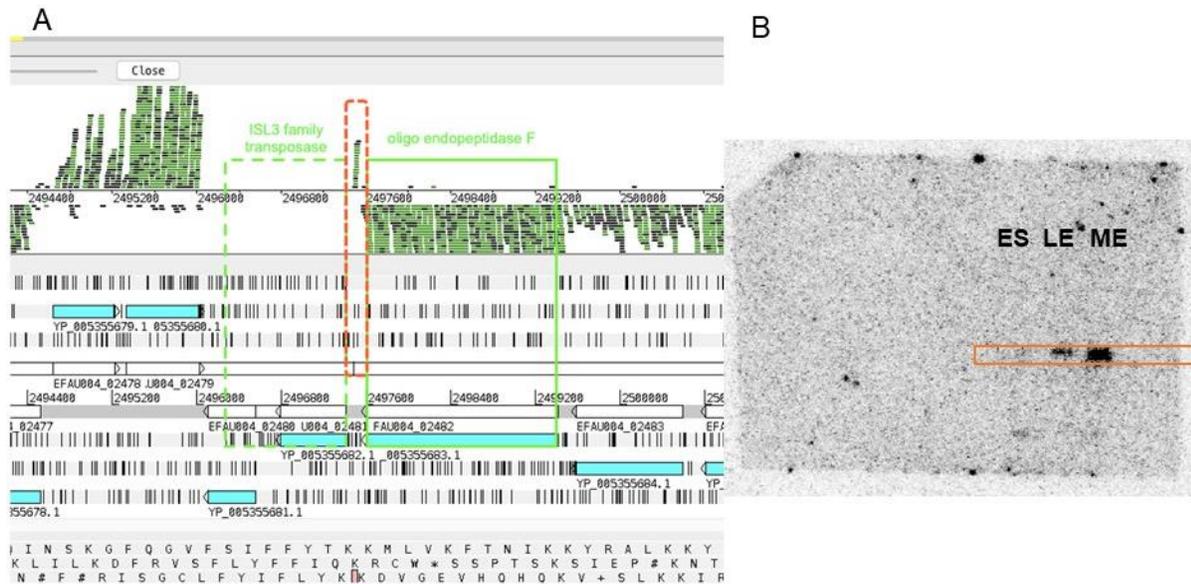


Figure 37. Résultats obtenus pour Ern2020.

- A) Visualisation de l'environnement génétique d'après les coordonnées prédites par Sinel *et al.*
- B) Quantification par Northern-Blot, le rectangle orange correspond à Ern2020.

6. Discussion

Ces travaux préliminaires de biologie moléculaire avaient pour objectif de compléter les premières données publiées sur les sARN d'*E. faecium* [81]. Les trois Ern sélectionnés étaient conservés dans les souches des clades A1 et A2 regroupant les souches pathogènes. En revanche, ils étaient tous les trois absents du clade B regroupant les souches commensales, suggérant un possible rôle dans la virulence ou l'adaptation aux stress environnementaux et/ou antibiotiques. La présence d'Ern2020 presque exclusivement au sein du clade A1, renforce l'hypothèse d'une fonction liée à la virulence ou à l'adaptation bactérienne. La diminution de l'expression des Ern0980 et Ern2020 à un stade tardif de la croissance bactérienne est également en faveur d'une possible implication dans la croissance de la bactérie. Le protocole de 5'3' RACE

mapping a, quant à lui, permis d'obtenir précisément la localisation de deux des trois Ern sélectionnés. L'expression d'Ern0560 ainsi que sa taille doivent être vérifiées par Northern-Blot, afin de pouvoir confirmer les données obtenues dans ce travail. Les données d'Ern0980 doivent être complétées RT-qPCR afin de quantifier l'expression d'*ern0980* plus précisément. Une fois ces données confirmées, il sera possible de concevoir, à partir de la souche de référence, des souches mutantes délétées de ces Ern. Il sera alors intéressant de comparer ces souches mutantes à la souche sauvage dans des études phénotypiques *in vitro* et/ou *in vivo*. Le comportement de ces souches pourra être étudié et comparé à la souche sauvage dans diverses conditions de stress, notamment un stress oxydatif, acide, ou généré par un milieu riche en sels biliaires. Il sera également contributif, selon les résultats obtenus *in vitro*, d'évaluer ces souches dans des modèles *in vivo* de colonisation et d'infection, pour mettre en avant un potentiel rôle de ces Ern dans la physiopathologie des infections à *E. faecium*. Des souches *trans*-complémentées, obtenues à partir des souches délétées et surexprimant les Ern devront également être construites pour approfondir les connaissances de ces Ern. Enfin, il sera indispensable de réaliser un travail de recherche des cibles de ces Ern, notamment à l'aide des données sur l'environnement génétique, non réalisé dans ce projet.

Ces travaux ont été réalisés en parallèle de la mise au point des modèles animaux et de l'étude d'Ern0160 décrits dans la suite de ce manuscrit. Nous avons malheureusement manqué de temps pour mener à bien l'ensemble des expérimentations nécessaires pour aboutir à la production de souches mutantes délétées, et les exploiter dans des études *in vitro* et *in vivo*. Il sera important de poursuivre ces travaux préliminaires pour déterminer le rôle de ces Ern et ainsi approfondir les connaissances sur la pathogénicité d'*E. faecium*.

BROMURE D'OTILONIUM

Le modèle de colonisation intestinale développé pour ce projet a également été mis en application dans un objectif différent. Une équipe des États-Unis (Bryan W. Davies, Austin, TX) nous a contacté afin de tester *in vivo* un composé actif *in vitro* contre les EfRV.

1. Composé

Le bromure d'otilonium (BO) (Figure 38) est un sel d'ammonium quaternaire, spasmolytique musculotrope et anticholinergique, actif sur les muscles lisses du colon. Il est utilisé dans certains pays pour le traitement du syndrome du côlon irritable. Une équipe américaine a montré dans une étude préliminaire que ce composé avait un effet bactéricide sur les EfRV et nous a contacté pour observer l'effet de la molécule *in vivo*.

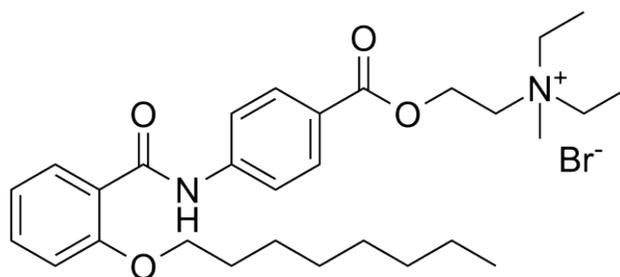


Figure 38. Structure chimique du bromure d'otilonium.

2. Animaux

Des souris femelles Swiss, âgées de 6 semaines, non consanguines, au statut « SPF » ont été utilisées. Elles étaient hébergées par cage de cinq, dans une pièce à température et luminosité contrôlées (cycle jour-nuit de 12h), et recevaient eau et nourriture stérilisées ad libitum. Les souris étaient acclimatées à l'animalerie pendant une semaine et chaque animal était identifié par un numéro unique.

3. Protocole

Les souris étaient préalablement décolonisées comme décrit précédemment à savoir par l'administration de ceftriaxone SC (2,4 mg/jour) pendant deux jour, associée à de l'amoxicilline ajoutée à l'eau de boisson (100 mg/L). A J0, les souris étaient colonisées avec 200 µL d'une suspension calibrée d'EfRV. La souche d'EfRV Aus0004 a été utilisée. Pendant le protocole une pression antibiotique était maintenue par de l'amoxicilline (33 mg/L) et de la ceftriaxone (100 mg/L) ajoutée à l'eau de boisson et les biberons d'eau étaient changés quotidiennement pour tenir compte de la stabilité des antibiotiques. A J6, J7 et J8, le bromure d'otilonium était administré par voie orale à raison de 200 µL à une concentration de 5 mg/mL deux fois par jour. Deux groupes témoins ont été réalisés en parallèle, un groupe recevant du NaCl 0,9% constituait le contrôle négatif (NaCl) et un groupe recevant de la téicoplanine à une concentration de 40 mg/kg/jour constituait le contrôle positif (TEC). La téicoplanine a été choisie en raison de la sensibilité de la souche à cette molécule (CMI = 0,5 mg/L). De plus, la téicoplanine administrée par voie orale n'étant pas absorbée au niveau intestinal, la concentration dans la lumière intestinale était élevée. Les molécules « contrôles » étaient administrées à la même fréquence que le BO. Des prélèvements étaient réalisés et mis en culture comme décrit dans la mise au point du modèle. Une BMF était obtenue par massage abdominal pour chaque souris, à J0 pour vérifier l'efficacité de la décolonisation, à J6 avant d'administrer le BO ou les contrôles afin de vérifier la colonisation à EfRV, puis à J7, J8, J12, J15 et J18 pour évaluer l'efficacité de la molécule. Les animaux étaient euthanasiés par inhalation de CO₂ à J18 et le caecum était prélevé, vidé de son contenu et mis en culture afin de quantifier la charge bactérienne tissulaire. Les prélèvements étaient pesés, mis en suspension dans du NaCl à 0,9% et mis en culture sur des milieux TS et BEA. Le protocole est synthétisé sur le Figure 39.

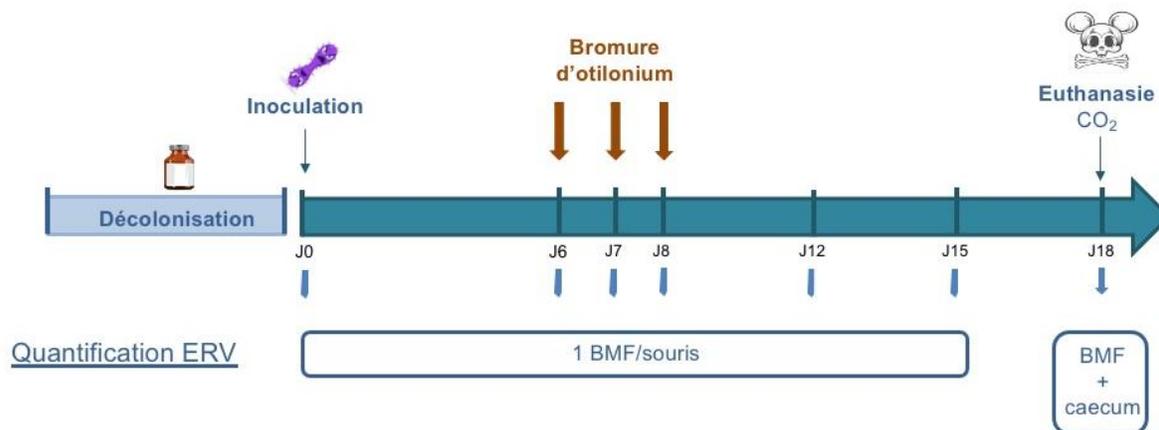


Figure 39. Étude du bromure d'otilonium : protocole expérimental
 BMF : boulette de matières fécales, ERV : *E. faecium* résistant à la vancomycine

4. Résultats

Ce protocole a été réalisé sur des groupes de cinq souris. Un inoculum concentré à $1,3 \times 10^9$ UFC/mL était administré. Les résultats sont représentés sur la Figure 40. Une charge bactérienne moyenne égale à $3,8 \times 10^9$, $5,8 \times 10^9$ et $5,3 \times 10^9$ UFC/g était retrouvée à J6 avant l'administration des molécules testées, dans les BMF des souris des groupes BO, TEC et NaCl respectivement. Aucune différence significative n'était observée entre les charges bactériennes des BMF des groupes BO et NaCl et ce, durant toute la durée du protocole. L'inoculum d'EfRV restait stable jusqu'à J15 avec en moyenne $3,4 \times 10^9$ UFC/g dans le groupe BO et $3,8 \times 10^9$ UFC/g dans le groupe NaCl. Les BMF des souris du groupe TEC contenaient en moyenne $5,5 \times 10^8$ UFC/g à J7 et $3,7 \times 10^6$ UFC/g à J8, cette réduction de l'inoculum était significative par rapport aux deux autres groupes ($p = 0,008$). A J12, quatre jours après l'arrêt de l'administration de l'antibiotique, la quantité d'ERV contenue dans les BMF était similaire à celle observée avant la prise de téicoplanine. Le protocole a été interrompu à J15 en raison de l'absence de résultat significatif observé sur les jours précédents.

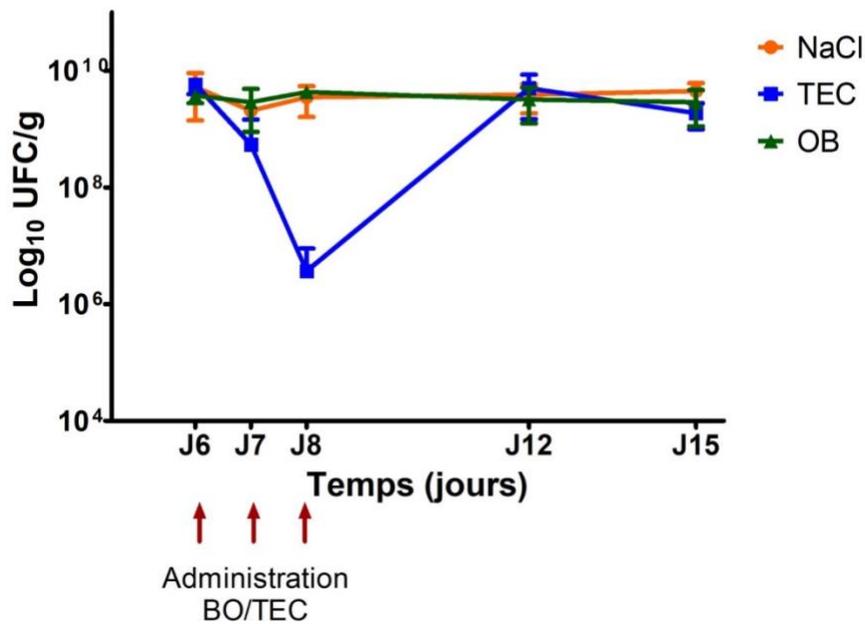


Figure 40. Charge bactérienne d'ERV moyenne contenue dans les BMF en fonction du temps et de la molécule administrée.

5. Discussion

Cette étude a permis de mettre en application le modèle de colonisation intestinale à *E. faecium* mis au point au début du travail avec un objectif différent de l'étude des sARN. En effet, le protocole visait à évaluer la capacité du BO à réduire la colonisation intestinale à EfRV. Alors qu'*in vitro* ce composé a montré un effet bactéricide sur les EfRV, aucun effet *in vivo* sur la colonisation à EfRV n'a été observé dans notre modèle. Nous avons peu de données sur les résultats obtenus *in vitro*, la dose utilisée ici n'était peut-être pas suffisante pour obtenir des résultats sur un inoculum important. La durée du traitement était possiblement également insuffisante pour voir un effet de la molécule. Des études complémentaires *in vitro* et *in vivo* seraient nécessaires pour évaluer le potentiel bactéricide de cette molécule.

Concernant le modèle de colonisation, les résultats ont montré qu'il était effectif pour évaluer l'effet de molécules sur *E. faecium*, notamment leur capacité à « décoloniser » le tube

digestif. Nous avons choisi la téicoplanine comme contrôle positif pour son effet bactéricide, et son administration possible par voie orale. De plus, l'absorption digestive est quasi-inexistante, ce qui garantit une concentration importante dans la lumière du tube digestif. La concentration a été adaptée à partir des doses administrées en clinique humaine. Pour obtenir une concentration équivalente, les doses « souris » rapportées au poids sont approximativement 12 fois supérieures aux doses humaines en raison du métabolisme de la souris. Ce principe est une approximation et est à adapter en fonction des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de la molécule étudiée. Ici, la téicoplanine servait uniquement de contrôle, une équivalence précise n'était pas nécessaire. Une réduction importante de la charge bactérienne a été observée durant l'administration de téicoplanine. A J12, la charge bactérienne des BMF avait de nouveau atteint la quantité initiale mais la forte diminution obtenue à J7 et J8 suggère qu'une décolonisation totale aurait probablement pu être obtenue si le traitement avait été prolongé. La téicoplanine apparaît donc être une molécule intéressante pouvant être utilisée comme contrôle dans une étude de décolonisation.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail avait pour objectif d'explorer le rôle des sARN dans la pathogénicité d'*E. faecium*, notamment *in vivo*. Le projet s'est articulé autour de deux axes principaux à savoir le développement de modèles animaux adaptés à l'étude des entérocoques et plus précisément des Ern, et de l'Ern0160. Deux axes secondaires, sont venus compléter ce travail avec la poursuite de la caractérisation des Ern à l'aide de techniques de biologie moléculaire, et la mise en application du modèle de colonisation intestinale dans un cadre hors étude des Ern.

Le développement de modèles animaux a permis d'aboutir à la mise en place et l'utilisation d'un modèle murin de colonisation intestinale à *E. faecium*. Les différents modèles décrits dans la littérature ont été comparés et adaptés afin d'obtenir un modèle de colonisation intestinale massive et stable à *E. faecium* avec l'utilisation d'antibiotiques fréquemment prescrits chez l'homme. Deux modèles d'infection sévère ont été développés mais nécessitent des ajustements afin d'être utilisés dans l'étude des Ern. Les complications rencontrées lors de la mise en place du modèle d'endocardite infectieuse devraient pouvoir être résolues en collaborant avec des équipes ayant mis en place ce modèle dans leur laboratoire. Le second modèle d'infection reposait sur le mécanisme de translocation bactérienne intestinale à l'origine d'une infection généralisée. Ce protocole, a été développé en fin de thèse et les résultats escomptés n'ont pas été obtenus. Néanmoins, ce modèle présente un intérêt important et sa mise au point doit être poursuivie en apportant des modifications adéquates. En effet, il permettrait de reproduire la physiopathologie des bactériémies à entérocoque survenant chez des patients hospitalisés dans les services d'oncohématologie et associées à une augmentation du risque de mortalité. La colonisation et l'infection seraient associées dans une seule et unique expérimentation permettant, à terme, une approche plus complète dans l'étude *in vivo* des Ern et de leurs fonctions, mais également dans l'étude des facteurs de virulence.

L'étude de l'Ern0160 a été conduite *in vitro* puis *in vivo*. L'ensemble des résultats obtenus suggèrent son implication dans le processus de colonisation intestinale. Les investigations doivent

être poursuivies, notamment la recherche des cibles régulées par ce sARN. Afin d'approfondir les résultats *in vivo*, ils pourront être complétés avec l'étude des souches dans un protocole de colonisation précoce, afin de déterminer si Ern0160 intervient dans les phases précoces de la colonisation. Une approche d'imagerie par bioluminescence serait également intéressante afin de suivre la chronologie et la localisation de la mise en place de la colonisation et d'évaluer l'implication d'Ern0160 dans ce processus. En parallèle, la recherche des cibles régulées par Ern0160 est indispensable et fait l'objet du travail de thèse du Dr Dejoies.

Des travaux préliminaires de biologie moléculaire ont permis de continuer les travaux sur les potentiels sARN d'*E. faecium* décrits par Sinel *et al.* en 2017. Ainsi des informations complémentaires ont pu être apportées pour trois d'entre eux. La poursuite de ce travail permettra d'identifier de nouveaux candidats pour les études *in vivo*. Enfin, le modèle de colonisation intestinale mis en place pour ce travail, a été utilisé pour évaluer le pouvoir bactéricide d'une molécule non décrite comme antibiotique. Cette hypothèse n'a pas été confirmée. En revanche, nous avons confirmé que le modèle était effectif pour l'étude d'*E. faecium* et ce, quel que soit l'objectif du projet.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Thiercelin ME, Jouhaud L. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène. *CR Soc Biol* 1899;**5**:269–71.
2. Maccallum WG, Hastings TW. A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* (nov. spec.), with a description of the microorganism. *J Exp Med* 1899;**4**:521–34.
3. Ludwig W, Seewaldt E, Kilpper-Balz R *et al.* The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Microbiology* 1985;**131**:543–51.
4. Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP *et al.* List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2020;**70**:5607–12.
5. Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev* 1990;**3**:46–65.
6. Mundt JO. Occurrence of enterococci in animals in a wild environment. *Appl Microbiol* 1963;**11**:136–40.
7. Martin JD, Mundt JO. Enterococci in insects. *Appl Microbiol* 1972;**24**:575–80.
8. Van Tyne D, Gilmore MS. Friend Turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Annu Rev Microbiol* 2014;**68**:337–56.
9. Lebreton F, Manson AL, Saavedra JT *et al.* Tracing the enterococci from Paleozoic origins to the hospital. *Cell* 2017;**169**:849-861.e13.
10. Mundt JO. Occurrence of enterococci on plants in a wild environment. *Appl Microbiol* 1963;**11**:141–4.
11. Mundt JO, Larsen SA, McCarty IE. Growth of lactic acid bacteria in waste waters of vegetable-processing plants. *Appl Microbiol* 1966;**14**:115–8.
12. Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A *et al.* Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev* 2012;**76**:685–706.
13. Dapkevicius M de LE, Sgardioli B, Câmara SPA *et al.* Current Trends of enterococci in dairy products: a comprehensive review of their multiple roles. *Foods* 2021;**10**:821.
14. Gaca AO, Lemos JA. Adaptation to adversity: the intermingling of stress tolerance and pathogenesis in enterococci. *Microbiol Mol Biol Rev* 2019;**83**:e00008-19.

15. Leclerc H, Devriese LA, Mossel D a. A. Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *Journal of Applied Bacteriology* 1996;**81**:459–66.
16. Vollaard EJ, Clasener HA. Colonization resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;**38**:409–14.
17. Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. Enterococcus diversity, origins in nature, and gut colonization. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al. (eds.). *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.
18. Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 2012;**10**:266–78.
19. Goh HMS, Yong MHA, Chong KKL *et al*. Model systems for the study of enterococcal colonization and infection. *Virulence* 2017;**8**:1525–62.
20. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 1994;**7**:462–78.
21. Said MS, Tirthani E, Lesho E. *Enterococcus* Infections. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.
22. Agudelo Higueta NI, Huycke MM. Enterococcal disease, epidemiology, and implications for treatment. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al. (eds.). *Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.
23. De Waele J, Lipman J, Sakr Y *et al*. Abdominal infections in the intensive care unit: characteristics, treatment and determinants of outcome. *BMC Infect Dis* 2014;**14**:420.
24. Blot S, Antonelli M, Arvaniti K *et al*. Epidemiology of intra-abdominal infection and sepsis in critically ill patients: “AbSeS”, a multinational observational cohort study and ESICM Trials Group Project. *Intensive Care Med* 2019;**45**:1703–17.
25. Montravers P, Dupont H, Leone M *et al*. Prise en charge des infections intra-abdominales. *Anesthésie & Réanimation* 2015;**1**:75–99.
26. Edey M, Hawley CM, McDonald SP *et al*. Enterococcal peritonitis in Australian peritoneal dialysis patients: predictors, treatment and outcomes in 116 cases. *Nephrol Dial Transplant* 2010;**25**:1272–8.
27. Mittal H, Wyawahare M, Sistla S. Microbiological profile of pathogens in spontaneous bacterial peritonitis secondary to liver cirrhosis: a retrospective study. *Trop Doct* 2020;**50**:138–41.
28. Kwon KT, Armstrong DG. Microbiology and Antimicrobial therapy for diabetic foot infections. *Infect Chemother* 2018;**50**:11–20.

29. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS *et al.* Infective endocarditis in adults: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 2015;CIR.0000000000000296.
30. Santé Publique France. *Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, mai-juin 2017*. Santé Publique France, 2019.
31. Weiner LM, Webb AK, Limbago B *et al.* Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2016;**37**:1288–301.
32. Roberts MC. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 2008;**282**:147–59.
33. Reissier S, Cattoir V. Streptogramins for the treatment of infections caused by Gram-positive pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2021;**19**:587–99.
34. O’Driscoll T, Crank CW. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect Drug Resist* 2015;**8**:217–30.
35. Turner AM, Lee JYH, Gorrie CL *et al.* Genomic insights into last-line antimicrobial resistance in multidrug-resistant *Staphylococcus* and vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Front Microbiol* 2021;**12**:637656.
36. García-Solache M, Rice LB. The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. *Clin Microbiol Rev* 2019;**32**:e00058-18.
37. Lebreton F, van Schaik W, McGuire AM *et al.* Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. *MBio* 2013;**4**,
38. Willems RJ, Bonten MJ. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2007;**20**:384–90.
39. Klevens RM, Edwards JR, Richards CL *et al.* Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Rep* 2007;**122**:160–6.
40. Colomb-Cotin M, Lacoste J, Brun-Buisson C *et al.* Estimating the morbidity and mortality associated with infections due to multidrug-resistant bacteria (MDRB), France, 2012. *Antimicrob Resist Infect Control* 2016;**5**:56.
41. Montealegre MC, Roh JH, Rae M *et al.* Differential Penicillin-Binding Protein 5 (PBP5) levels in the *Enterococcus faecium* clades with different levels of ampicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;**61**:e02034-16.
42. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. 2019:110.

43. Cattoir V, Leclercq R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *J Antimicrob Chemother* 2013;**68**:731–42.
44. Costa Y, Galimand M, Leclercq R *et al.* Characterization of the chromosomal aac(6')-II gene specific for *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;**37**:1896–903.
45. Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal Infection—Treatment and antibiotic resistance. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, *et al.* (eds.). *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.
46. Kelesidis T, Tewhey R, Humphries RM. Evolution of high-level daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy is associated with limited mutations in the bacterial genome. *J Antimicrob Chemother* 2013;**68**:1926–8.
47. Tran TT, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of drug resistance: daptomycin resistance. *Ann N Y Acad Sci* 2015;**1354**:32–53.
48. Diaz L, Tran TT, Munita JM *et al.* Whole-genome analyses of *Enterococcus faecium* isolates with diverse daptomycin MICs. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;**58**:4527–34.
49. Kelesidis T, Humphries R, Uslan DZ *et al.* De novo daptomycin-nonsusceptible enterococcal infections. *Emerging Infect Dis* 2012;**18**:674–6.
50. Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C *et al.* The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;**50**:2500–5.
51. Marshall SH, Donskey CJ, Hutton-Thomas R *et al.* Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;**46**:3334–6.
52. Bender JK, Cattoir V, Hegstad K *et al.* Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature. *Drug Resistance Updates* 2018;**40**:25–39.
53. Wang Y, Lv Y, Cai J *et al.* A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicol and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother* 2015;**70**:2182–90.
54. Cattoir V, Isnard C, Cosquer T *et al.* Genomic analysis of reduced susceptibility to tigecycline in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;**59**:239–44.
55. Beabout K, Hammerstrom TG, Perez AM *et al.* The ribosomal S10 protein is a general target for decreased tigecycline susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;**59**:5561–6.
56. Beabout K, Hammerstrom TG, Wang TT *et al.* Rampant Parasexuality evolves in a hospital pathogen during antibiotic selection. *Mol Biol Evol* 2015;**32**:2585–97.

57. Fiedler S, Bender JK, Klare I *et al.* Tigecycline resistance in clinical isolates of *Enterococcus faecium* is mediated by an upregulation of plasmid-encoded tetracycline determinants tet(L) and tet(M). *J Antimicrob Chemother* 2016;**71**:871–81.
58. Top J, Willems R, Bonten M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;**52**:297–308.
59. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J *et al.* Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1988;**1**:57–8.
60. Leclercq R, Derlot E, Duval J *et al.* Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* 1988;**319**:157–61.
61. Weiner-Lastinger LM, Abner S, Edwards JR *et al.* Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015–2017. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2020;**41**:1–18.
62. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis* 2008;**197**:1079–81.
63. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ *et al.* Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2020;**33**:e00181-19.
64. Organisation Mondiale de la Santé. L'OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques. 2017.
65. Willey J, Woolverton CJ, Sherwood LM. *Microbiologie de Prescott*. 4th ed. De Boeck Supérieur, 2013.
66. Holmqvist E, Wagner EGH. Impact of bacterial sRNAs in stress responses. *Biochem Soc Trans* 2017;**45**:1203–12.
67. Wagner EGH, Romby P. Small RNAs in Bacteria and Archaea. *Advances in Genetics*. Vol 90. Elsevier, 2015, 133–208.
68. Waters LS, Storz G. Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell* 2009;**136**:615–28.
69. Brantl S. Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. *Curr Opin Microbiol* 2007;**10**:102–9.
70. Pappesch R, Warnke P, Mikkat S *et al.* The Regulatory Small RNA MarS supports virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Sci Rep* 2017;**7**:12241.
71. Sauder AB, Kendall MM. A pathogen-specific sRNA influences enterohemorrhagic *Escherichia coli* fitness and virulence in part by direct interaction with the transcript encoding the ethanolamine utilization regulatory factor EutR. *Nucleic Acids Res* 2021:gkab863.

72. Wilderman PJ, Sowa NA, FitzGerald DJ *et al.* Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:9792–7.
73. Gogol EB, Rhodius VA, Papenfort K *et al.* Small RNAs endow a transcriptional activator with essential repressor functions for single-tier control of a global stress regulon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;**108**:12875–80.
74. Vanderpool CK, Gottesman S. Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Mol Microbiol* 2004;**54**:1076–89.
75. Mika F, Hengge R. Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm architecture of *Escherichia coli*. *RNA Biol* 2014;**11**:494–507.
76. Felden B, Cattoir V. Bacterial adaptation to antibiotics through regulatory RNAs. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;**62**, DOI: 10.1128/AAC.02503-17.
77. Innocenti N, Golumbeanu M, Fouquier d’Hérouël A *et al.* Whole-genome mapping of 5’ RNA ends in bacteria by tagged sequencing: a comprehensive view in *Enterococcus faecalis*. *RNA* 2015;**21**:1018–30.
78. Fouquier d’Hérouël A, Wessner F, Halpern D *et al.* A simple and efficient method to search for selected primary transcripts: non-coding and antisense RNAs in the human pathogen *Enterococcus faecalis*. *Nucleic Acids Res* 2011;**39**:e46.
79. Michaux C, Hartke A, Martini C *et al.* Involvement of *Enterococcus faecalis* small RNAs in stress response and virulence. *Infection and Immunity* 2014;**82**:3599–611.
80. Shioya K, Michaux C, Kuenne C *et al.* Genome-Wide identification of small RNAs in the opportunistic pathogen *Enterococcus faecalis* V583. *PLoS One* 2011;**6**:e23948.
81. Sinel C, Augagneur Y, Sassi M *et al.* Small RNAs in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* involved in daptomycin response and resistance. *Sci Rep* 2017;**7**, DOI: 10.1038/s41598-017-11265-2.
82. Michaux C, Hansen EE, Jenniches L *et al.* Single-Nucleotide RNA Maps for the two major nosocomial pathogens *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;**10**:600325.
83. Chapouthier G. *Au bon vouloir de l’homme, l’animal.*, 1990.
84. Gourevitch D, Bonnet-Cadilhac C. A propos des animaux d’experimentation chez Galien. *Histoire des Sciences Médicales* 2013;**47**:311–24.
85. <http://animaltestingfrance>. L’expérimentation animale à travers l’Histoire - Animal Testing. 2018.

86. Mendes H. Claude Bernard et l'origine de l'expérimentation animale moderne. *Bibnum* 2012.
87. Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. *Utilisation Des Animaux à Des Fins Scientifiques Dans Les Établissements Français. Enquête Statistique 2019*. Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, 2019.
88. Chapouthier G. L'évolution de l'expérimentation animale : Claude Bernard et la période-clé du XIXe siècle. 1998.
89. Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E *et al*. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002;**420**:520–62.
90. Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 2005;**5**:591–602.
91. Perlman RL. Mouse models of human disease. *Evol Med Public Health* 2016;**2016**:170–6.
92. Brito-Casillas Y, Melián C, Wägner AM. Study of the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus through animal models. *Endocrinol Nutr* 2016;**63**:345–53.
93. Rasmussen AL, Okumura A, Ferris MT *et al*. Host genetic diversity enables Ebola hemorrhagic fever pathogenesis and resistance. *Science* 2014;**346**:987–91.
94. Schöner J, Heinz A, Endres M *et al*. Post-traumatic stress disorder and beyond: an overview of rodent stress models. *J Cell Mol Med* 2017;**21**:2248–56.
95. Barré-Sinoussi F, Montagutelli X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Future Science OA* 2015;**1**, DOI: 10.4155/fso.15.63.
96. Académie Vétérinaire de France. Rapport de la commission relation Homme-Animaux sur la recherche scientifique et l'expérimentation animale : état de la question. Approuvé en Mai 2012. *bavf* 2017;**170**:1–113.
97. Hardin-Pouzet H, Morosan S. Des souris, des rats et des hommes: En quoi les modèles rongeurs restent indispensables pour la production de connaissances. *Med Sci (Paris)* 2019;**35**:479–82.
98. Iqbal J, Chamberlain J, Francis SE *et al*. Role of Animal Models in Coronary Stenting. *Ann Biomed Eng* 2016;**44**:453–65.
99. Mohiuddin MM, Reichart B, Byrne GW *et al*. Current status of pig heart xenotransplantation. *Int J Surg* 2015;**23**:234–9.
100. Garsin DA, Frank KL, Silanpää J *et al*. Pathogenesis and models of enterococcal infection. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al. (eds.). *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.
101. Lebreton F, Le Bras F, Reffuveille F *et al*. *Galleria mellonella* as a model for studying *Enterococcus faecium* host persistence. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2011;**21**:191–6.

102. Garsin DA, Sifri CD, Mylonakis E *et al.* A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**:10892–7.
103. Maadani A, Fox KA, Mylonakis E *et al.* *Enterococcus faecalis* mutations affecting virulence in the *Caenorhabditis elegans* model host. *Infect Immun* 2007;**75**:2634–7.
104. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. *Nature* 2007;**449**:811–8.
105. Estavoyer B, Soudja S. [Gut microbiota of wild mice and laboratory mice differ significantly in conferring resistance to viral infection and cancer]. *Med Sci (Paris)* 2018;**34**:609–11.
106. Kommineni S, Bretl DJ, Lam V *et al.* Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian GI tract. *Nature* 2015;**526**:719.
107. Hendrickx APA, Top J, Bayjanov JR *et al.* Antibiotic-driven dysbiosis mediates intraluminal agglutination and alternative segregation of *Enterococcus faecium* from the intestinal epithelium. *mBio* 2015;**6**:e01346-01315.
108. Hendrickx APA, Kamer D van de, Willems RJL. Primary murine mucosal response during cephalosporin-induced intestinal colonization by *Enterococcus faecium*. *MicrobiologyOpen* 2018;**0**:e00602.
109. Top J, Paganelli FL, Zhang X *et al.* The *Enterococcus faecium* Enterococcal biofilm regulator, ebrb, regulates the esp operon and is implicated in biofilm formation and intestinal colonization. *PLoS One* 2013;**8**, DOI: 10.1371/journal.pone.0065224.
110. Zhang X, Top J, de Been M *et al.* Identification of a genetic determinant in clinical *Enterococcus faecium* strains that contributes to intestinal colonization during antibiotic treatment. *J Infect Dis* 2013;**207**:1780–6.
111. Montealegre MC, Singh KV, Murray BE. Gastrointestinal tract colonization dynamics by different *Enterococcus faecium* clades. *J Infect Dis* 2016;**213**:1914–22.
112. Heikens E, Leendertse M, Wijnands LM *et al.* Enterococcal surface protein Esp is not essential for cell adhesion and intestinal colonization of *Enterococcus faecium* in mice. *BMC Microbiology* 2009;**9**:19.
113. Ubeda C, Taur Y, Jenq RR *et al.* Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest* 2010;**120**:4332–41.
114. Caballero S, Kim S, Carter RA *et al.* Cooperating commensals restore colonization resistance to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Cell Host Microbe* 2017;**21**:592-602.e4.
115. Durack DT, Beeson PB. Experimental bacterial endocarditis. *Br J Exp Pathol* 1972;**53**:44–9.

116. Lung B. Endocardite infectieuse. Épidémiologie, physiopathologie et anatomopathologie. *La Presse Médicale* 2019;**48**:513–21.
117. Holland TL, Baddour LM, Bayer AS *et al.* Infective endocarditis. *Nat Rev Dis Primers* 2016;**2**:16059.
118. Baddour LM, Christensen GD, Lowrance JH *et al.* Pathogenesis of experimental endocarditis. *Rev Infect Dis* 1989;**11**:452–63.
119. Kinsella RA, Sherburne CC. Experimental production of *Streptococcus* endocarditis with glomerular nephritis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1923;**20**:252–3.
120. Garrison F. Experimental endocarditis. I. Staphylococcal endocarditis in rabbits resulting from placement of a polyethylene catheter in the right side of the heart. *The Yale journal of biology and medicine* 1970;**42**:394–410.
121. Héraïef E, Glauser MP, Freedman LR. Natural history of aortic valve endocarditis in rats. *Infect Immun* 1982;**37**:127–31.
122. Santoro J, Levison ME. Rat model of experimental endocarditis. *Infect Immun* 1978;**19**:915–8.
123. Plantefeve G, Bleichner G. Translocation bactérienne : mythe ou réalité ? *Réanimation* 2001;**10**:550–61.
124. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979;**23**:403–11.
125. Dahlgren D, Sjöblom M, Hellström PM *et al.* Chemotherapeutics-Induced intestinal mucositis: pathophysiology and potential treatment strategies. *Front Pharmacol* 2021;**12**:681417.
126. Fritsch J, Abreu MT. The microbiota and the immune response: what is the chicken and what is the egg? *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2019;**29**:381–93.
127. Mondot S, de Wouters T, Doré J *et al.* The human gut microbiome and its dysfunctions. *Dig Dis* 2013;**31**:278–85.
128. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2014;**60**:197–209.
129. Berg RD. Immunosuppression and intestinal bacterial overgrowth synergistically promote bacterial translocation. *Archives of Surgery* 1988;**123**:1359.
130. Faber J, van Limpt K, Kegler D *et al.* Bacterial translocation is reduced by a specific nutritional combination in mice with chemotherapy-induced neutropenia. *J Nutr* 2011;**141**:1292–8.

131. Green SI, Ajami NJ, Ma L *et al.* Murine model of chemotherapy-induced extraintestinal pathogenic escherichia coli translocation. *Infect Immun* 2015;**83**:3243–56.
132. Koh AY, Priebe GP, Pier GB. Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of gastrointestinal colonization and dissemination in neutropenia. *Infect Immun* 2005;**73**:2262–72.
133. Rauch S, Gough P, Kim HK *et al.* Vaccine protection of leukopenic mice against *Staphylococcus aureus* bloodstream infection. *Infect Immun* 2014;**82**:4889–98.
134. Miyazaki S, Fujikawa T, Kobayashi I *et al.* Development of systemic bacteraemia after oral inoculation of vancomycin-resistant enterococci in mice. *J Med Microbiol* 2001;**50**:695–701.
135. Alevizakos M, Gaitanidis A, Nasioudis D *et al.* Colonization With vancomycin-resistant enterococci and risk for bloodstream infection among patients with malignancy: a systematic review and meta-analysis. *Open Forum Infect Dis* 2017;**4**:ofw246.
136. Ford CD, Gazdik MA, Lopansri BK *et al.* Vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization and bacteremia and hematopoietic stem cell transplantation outcomes. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2017;**23**:340–6.
137. Potter M. New anti-cancer therapies, new opportunities for infection. *Curr Opin Infect Dis* 1999;**12**:359–63.
138. Vydra J, Shanley RM, George I *et al.* Enterococcal bacteremia is associated with increased risk of mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2012;**55**:764–70.
139. Lam MMC, Seemann T, Bulach DM *et al.* Comparative analysis of the first complete *Enterococcus faecium* genome. *J Bacteriol* 2012;**194**:2334–41.
140. Rodriguez-Palacios A, Khoretonenko MV, Ilic S. Institutional protocols for the oral administration (gavage) of chemicals and microscopic microbial communities to mice: Analytical consensus. *Exp Biol Med (Maywood)* 2019;**244**:459–70.
141. Scarborough J, Mueller F, Arban R *et al.* Preclinical validation of the micropipette-guided drug administration (MDA) method in the maternal immune activation model of neurodevelopmental disorders. *Brain Behav Immun* 2020;**88**:461–70.
142. Montealegre MC, Singh KV, Somarajan SR *et al.* Role of the Emp pilus subunits of *Enterococcus faecium* in biofilm formation, adherence to host extracellular matrix components, and experimental infection. *Infection and Immunity* 2016;**84**:1491.
143. Herrera-Hidalgo L, López-Cortes LE, Luque-Márquez R *et al.* Ampicillin and ceftriaxone solution stability at different temperatures in outpatient parenteral antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2020;**64**:e00309-20.
144. OMÉDIT Centre Val de Loire. Reconstitution et durée de stabilité des anti-infectieux injectables. 2016:35.

145. Leeming ER, Johnson AJ, Spector TD *et al.* Effect of diet on the gut microbiota: rethinking intervention duration. *Nutrients* 2019;**11**:2862.
146. AbdelKhalek A, Abutaleb NS, Mohammad H *et al.* Repurposing ebselen for decolonization of vancomycin-resistant enterococci (VRE). *PLoS One* 2018;**13**:e0199710.
147. Li X, Song L, Zhu S *et al.* Two Strains of Lactobacilli Effectively Decrease the colonization of VRE in a mouse model. *Front Cell Infect Microbiol* 2019;**9**, DOI: 10.3389/fcimb.2019.00006.
148. McKenney PT, Yan J, Vaubourgeix J *et al.* Intestinal Bile acids induce a morphotype switch in vancomycin resistant *Enterococcus* that facilitates intestinal colonization. *Cell Host Microbe* 2019;**25**:695-705.e5.
149. Morley VJ, Kinnear CL, Sim DG *et al.* An adjunctive therapy administered with an antibiotic prevents enrichment of antibiotic-resistant clones of a colonizing opportunistic pathogen. *eLife* 2020;**9**:e58147.
150. Forrest GN, Arnold RS, Gammie JS *et al.* Single center experience of a vancomycin resistant enterococcal endocarditis cohort. *J Infect* 2011;**63**:420–8.
151. Reissier S, Saleh-Mghir A, Guerin F *et al.* *In vivo* daptomycin efficacy against experimental vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* endocarditis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2018;**73**:981–6.
152. Zuluaga AF, Salazar BE, Rodriguez CA *et al.* Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. *BMC Infect Dis* 2006;**6**:55.
153. Dejoies L, Le Neindre K, Reissier S *et al.* Distinct expression profiles of regulatory RNAs in the response to biocides in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium*. *Sci Rep* 2021;**11**:6892.
154. Le Neindre K. Etude fonctionnelle de nouveaux ARN régulateurs exprimés chez *Enterococcus Faecium*. (thèse) 2021.
155. Deol P, Zaiss DMW, Monaco JJ *et al.* Rates of processing determine the immunogenicity of immunoproteasome-generated epitopes. *J Immunol* 2007;**178**:7557–62.
156. Bronsard J, Pascreau G, Sassi M *et al.* sRNA and cis-antisense sRNA identification in *Staphylococcus aureus* highlights an unusual sRNA gene cluster with one encoding a secreted peptide. *Sci Rep* 2017;**7**:4565.

ANNEXES

Annexe 1 : Prix Nobel de physiologie ou médecine décernés à des travaux ayant eu recours à des modèles murins (Hardin-Pouzet et Morosan, 2019) [97]

Année	Lauréats	Thèmes
1928	C. Nicolle	Pathogenèse du typhus
1939	G. Domagk	Effets antibactériens du Pronostil®
1943	E.A. Doisy, H. Dam	Découverte de la fonction de la vitamine K
1945	A. Fleming, E.B. Chain, H. Florey	Découverte de la pénicilline
1951	M. Theiler	Vaccin contre la fièvre jaune
1954	J.F. Enders, T.H. Wellers, F.C. Robbins	Vaccin contre la poliomyélite
1964	K.E. Bloch, F. Lynen	Régulation du métabolisme du cholestérol et des acides gras
1966	F.P. Rous, C.B. Huggins	Virus induisant des tumeurs et traitement hormonaux des cancers
1968	R. Holley, G. Khorana, M. Nirenberg	Interprétation du code génétique et synthèse des protéines
1970	J. Axelrod, B. Katz, U. von Euler	Physiologie des neurotransmetteurs
1974	A. Claude, C. de Duve, G. Palade	Organisation fonctionnelle et structurale des cellules
1975	H.M. Temin, R. Dulbecco, D. Baltimore	Interactions entre les virus oncogènes et le génome
1980	J. Dausset, J.D. Snell, B. Benaceraff	Description et fonction du complexe majeur d'histocompatibilité
1982	S.K. Bergström, B.I. Samuelsson, J.R. Vane	Découverte des prostaglandines
1984	N. Jerne, G. Köhler, C. Milstein	Principe de production des anticorps monoclonaux
1985	M.S. Brown, J.L. Goldstein	Découverte de la régulation du métabolisme du cholestérol
1986	S. Cohen, R. Levi-Montalcini	Facteur de croissance des nerfs (NGF) et facteur de croissance épidermique (EGF)
1987	S. Tonegawa	Principes génétiques à l'origine de la diversité des anticorps
1988	J. Black, G.B. Bion, G.H. Hitchings	Découverte des facteurs les plus importants pour la conception des médicaments
1996	P. Doherty, R. Zinkernagel	Reconnaissance par le système immunitaire de cellules infectées par un virus
1997	S. Prusiner	Découverte des prions
1999	G. Blobel	Découverte des signaux intrinsèques des protéines permettant leur localisation et leur transport dans la cellule
2000	A. Carlsson, P. Greengard, E.R. Kandel	Transduction du signal nerveux
2004	R. Axel, L.B. Buck	Récepteurs olfactifs et organisation du système olfactif
2007	M.R. Capecchi, M.J. Evans, O. Smithies	Principe de l'introduction spécifique d'une modification génétique, cellules embryonnaires souches
2008	H. zur Hausen, F. Barré-Sinoussi, L. Montagnier	Découverte des papillomavirus et du virus de l'immunodéficience humaine
2009	E. Blackburn, C. Greider, J. Szostak	Protection des chromosomes par les télomères et la télomérase
2010	R. Edwards	Développement de la fécondation <i>in vitro</i>
2011	J. Hoffmann, B. Beutler, R. Steinman	Système immunitaire inné et cellules dendritiques
2012	J.B. Gurdon, S. Yamanaka	Reprogrammation des cellules pour devenir pluripotentes
2014	J. O'Keefe, M.B. Moser, E.I. Moser	Centre GSP du cerveau et positionnement dans l'espace

DEMANDE D'AUTORISATION DE PROJET UTILISANT DES ANIMAUX A DES FINS SCIENTIFIQUES

Ce formulaire a pour objectif de rassembler les informations permettant au comité d'éthique dont relève l'établissement utilisateur où sera réalisé le projet utilisant des animaux à des fins scientifiques, d'évaluer éthiquement le projet et au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche d'autoriser le projet suite à l'évaluation éthique.

Le fichier de ce formulaire ainsi que la notice d'aide pour le renseigner peuvent être demandés à : autorisation-projet@recherche.gouv.fr

Le projet est défini comme un programme de travail répondant à un objectif scientifique défini, utilisant un ou plusieurs modèles animaux et impliquant une ou plusieurs procédures expérimentales (article R-214-89 du Code rural et de la pêche maritime).

Le formulaire renseigné sera envoyé par lettre recommandée avec accusé de réception à l'adresse suivante :

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche – Direction Générale pour la Recherche et l'Innovation – Secrétariat « Autorisation de projet » - 1, rue Descartes, 75231 PARIS cedex 5

N.B. A l'exception des duplications des blocs permises et repérées par ..., aucune modification des items de ce formulaire ne doit être effectuée.

1. INFORMATIONS GÉNÉRALES

1.1. TITRE DU PROJET :

1.2. Durée du projet :

1.3. Date prévue de début du projet :

2. RÉSUMÉ NON TECHNIQUE

3. INFORMATIONS ADMINISTRATIVES ET RÉGLEMENTAIRES

3.1. L'établissement utilisateur (EU)

3.1.1. Agrément de l'EU où seront utilisés les animaux :

- Nom :
- Numéro d'agrément :
- Date de délivrance de l'agrément :
- Nom et prénom du responsable :
- Adresse électronique du responsable :
- Nom et prénom de la personne délégataire du responsable présente dans l'EU :
- Adresse électronique de ce délégataire :

3.1.2. Comité d'éthique agréé par le MESR dont relève l'EU :

3.1.3. Responsable(s) de la mise en œuvre générale du projet dans l'EU et de sa conformité à l'autorisation de projet :

Nombre de responsables :

Responsable :

- Nom et prénom :
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) :
- Adresse électronique :
- Téléphone :



3.1.4. Responsable(s) du bien-être des animaux :

Nombre de responsables :

Responsable :

- Nom et prénom :
- Adresse postale (avec le nom du laboratoire) :
- Adresse électronique :
- Téléphone :



3.2. Le personnel

- **Compétences des personnes participant au projet :**

- la conception des procédures expérimentales et des projets oui non
- l'application de procédures expérimentales aux animaux oui non
- les soins aux animaux oui non
- la mise à mort des animaux oui non

3.3. Le projet

3.3.1. L'objectif du projet :

Est-il :

- justifié du point de vue éducatif ?
- requis par la loi ?
- justifié du point de vue scientifique ?

Informations sur cette justification :

3.3.2. Description du projet :

3.3.3. Précisez, le cas échéant, la ou les méthodes de mise à mort prévue(s) :

3.3.4. Précisez, le cas échéant, les éléments scientifiques justifiant la demande de dérogation concernant la méthode de mise à mort envisagée :

3.3.5. Stratégie d'expérimentation ou d'observation et approche statistique utilisée afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, la douleur, la souffrance et l'anxiété, infligées et l'impact environnemental, le cas échéant – si une étude statistique est prévue, indiquez et justifiez les tests choisis :

3.4. Les animaux

3.4.1. Justifiez la nécessité d'avoir recours à des animaux pour atteindre les objectifs du projet :

3.4.2. Espèces animales ou types d'animaux utilisés :

- Souris (*Mus musculus*)
- Rats (*Rattus norvegicus*)

Cobayes (<i>Cavia porcellus</i>)	<input type="checkbox"/>
Hamsters (syriens) (<i>Mesocricetus auratus</i>)	<input type="checkbox"/>
Hamsters (chinois) (<i>Cricetulus griseus</i>)	<input type="checkbox"/>
Gerbilles de Mongolie (<i>Meriones unguiculatus</i>)	<input type="checkbox"/>
Autres rongeurs (<i>Rodentia</i>)	<input type="checkbox"/>
Lapins (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	<input type="checkbox"/>
Chats (<i>Felis catus</i>)	<input type="checkbox"/>
Chiens (<i>Canis familiaris</i>)	<input type="checkbox"/>
Furets (<i>Mustela putorius furo</i>)	<input type="checkbox"/>
Autres carnivores (<i>carnivora</i>)	<input type="checkbox"/>
Chevaux, ânes et croisements (<i>Equidae</i>)	<input type="checkbox"/>
Porcs (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	<input type="checkbox"/>
Caprins (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	<input type="checkbox"/>
Ovins (<i>Ovis aries</i>)	<input type="checkbox"/>
Bovins (<i>Bos primigenius</i>)	<input type="checkbox"/>
Prosimiens (<i>prosimia</i>)	<input type="checkbox"/>
Ouistitis et tamarins (<i>par exemple, Callithrix jacchus</i>)	<input type="checkbox"/>
Singe cynomolgus (<i>Macaca fascicularis</i>)	<input type="checkbox"/>
Singe rhésus (<i>Macaca mulatta</i>)	<input type="checkbox"/>
Vervets <i>chlorocebus</i> spp. (généralement soit <i>pygerythrus</i> , soit <i>sabaeus</i>)	<input type="checkbox"/>
Babouins (<i>Papio</i> spp.)	<input type="checkbox"/>
Saimiris (par exemple, <i>Saimiri sciureus</i>)	<input type="checkbox"/>
Autres espèces de primates non humains (autres espèces de <i>Ceboidea</i> et <i>Cercopithecoidea</i>)	<input type="checkbox"/>
Singes anthropoïdes (<i>Hominoidea</i>)	<input type="checkbox"/>
Autres mammifères (autres <i>Mammalia</i>)	<input type="checkbox"/>
Poules domestiques (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	<input type="checkbox"/>
Autres oiseaux (autres <i>Aves</i>)	<input type="checkbox"/>
Reptiles (<i>Reptilia</i>)	<input type="checkbox"/>
Grenouilles Rana (<i>Rana temporaria</i> et <i>Rana pipiens</i>)	<input type="checkbox"/>
Grenouilles Xenopus (<i>Xenopus laevis</i> et <i>Xenopus tropicalis</i>)	<input type="checkbox"/>
Autres amphibiens (autres <i>Amphibia</i>)	<input type="checkbox"/>
Poissons zèbres (<i>Danio rerio</i>)	<input type="checkbox"/>
Autres poissons (autres <i>Pisces</i>)	<input type="checkbox"/>
Céphalopodes (<i>Cephalopoda</i>)	<input type="checkbox"/>

3.4.3. Justifiez la pertinence de l'(des) espèce(s) animale(s) choisie(s) :

3.4.4. S'agit-il de spécimens d'espèces menacées énumérées à l'annexe A du règlement (CE) n° 338/97 du Conseil du 9 décembre 1996 relatif à la protection des espèces de faune et de flore sauvages par le contrôle et leur commerce ?

Oui Onon

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres espèces que celles énumérées dans cette annexe :

3.4.5. S'agit-il de spécimens de primates non humains ? **Ooui Onon**

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres espèces de primates non humains

3.4.6. S'agit-il d'animaux capturés dans la nature ? **Ooui Onon**

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres animaux que ceux capturés dans la nature :

3.4.7. S'agit-il d'animaux d'espèces domestiques, errants ou vivant à l'état sauvage ? **O oui Onon**

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte qu'en utilisant ces animaux.

3.4.8. Catégorie des animaux utilisés dans le projet :

- Animaux tenus en captivité (domestiques ou non domestiques)**
Animaux non domestiques non tenus en captivité
Animaux génétiquement altérés

○ **Animaux non domestiques non tenus en captivité**

- **Si les animaux utilisés sont des spécimens d'espèces protégées en application de l'article L. 411-1 du Code de l'environnement, indiquez les références de la dérogation accordée pour effectuer la capture des animaux dans le milieu naturel (4° de l'article L. 411-2 du Code de l'environnement) :**

- **Si les animaux utilisés sont des spécimens d'espèces dont la chasse est autorisée, indiquez ici les références de l'autorisation de prélèvement accordée pour effectuer la capture des animaux dans le milieu naturel (article L. 424-11 du Code de l'environnement) :**

- **Justification scientifique montrant que l'objectif de la procédure expérimentale ne peut être atteint en utilisant un animal élevé en vue d'une utilisation dans des procédures expérimentales :**

- **Animaux génétiquement altérés**
 - **Animaux génétiquement modifiés** Ooui Onon
Si oui :
 - **Création d'une lignée** Ooui Onon
 - **Maintien d'une lignée établie et/ou utilisation** Ooui Onon
 - **Phénotype non dommageable** Ooui Onon
 - **Phénotype dommageable** Ooui Onon
 - **Souche mutante autre** Ooui Onon
Si oui :
 - **Création d'un mutant** Ooui Onon
 - **Maintien d'une lignée établie et/ou utilisation** Ooui Onon
 - **Phénotype non dommageable** Ooui Onon
 - **Phénotype dommageable** Ooui Onon

3.4.9. Origine des animaux tenus en captivité :

- **Les animaux destinés à être utilisés dans les procédures expérimentales appartenant aux espèces dont la liste est fixée réglementairement sont-ils élevés à cette fin et proviennent-ils d'éleveurs ou de fournisseurs agréés ?**
O oui Onon

- **Si oui, nombre d'établissements éleveur ou fournisseur agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet :**

Etablissement :

- **Nom :**

- **Adresse postale :**

- **Animaux fournis :**



- **Si non, justifier scientifiquement l'utilisation d'animaux qui ne proviennent pas d'éleveurs ou de fournisseurs agréés :**

○ **Votre propre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ?** Ooui Onon

○ **Un autre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ?** Ooui Onon

○ **Nombre d'établissements éleveur occasionnel non agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet ?**

Etablissement :

• **Nom :**

• **Adresse postale :**

• **Animaux fournis :**



○ **Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur localisés dans des Etats membres autres que la France fournissant tout ou partie des animaux du projet ?**

Etablissement :

Nom de cet éleveur ou fournisseur et pays :



○ **Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur localisés dans des pays tiers fournissant tout ou partie des animaux du projet ?**

Etablissement :

Nom de cet éleveur ou fournisseur et pays :



○ **Les animaux sont-ils des animaux réutilisés d'un projet précédent ?** Ooui Onon

Si oui, veuillez compléter le chapitre 4.3 de ce formulaire.

3.4.10. Nombre estimé d'animaux utilisés dans le projet :

○ **Justification de ce nombre pour chacune des espèces animales utilisées :**

3.4.11. Indiquez à quel(s) stade(s) de développement les animaux seront utilisés et le justifier :

3.4.12. Indiquez le sexe des animaux utilisés et le justifier :

3.4.13. Indiquez pour chaque espèce les points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter la douleur à son minimum, sans remettre en cause les résultats du projet :

4. LES PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

4.1 Objet(s) visés par les procédures expérimentales

A - La recherche fondamentale.

B - Les recherches transactionnelles ou appliquées menées pour :
- la prévention, la prophylaxie, le diagnostic ou le traitement de maladies, de mauvais états de santé ou d'autres anomalies ou de leurs effets chez l'homme, les animaux ou les plantes ;
- l'évaluation, la détection, le contrôle ou les modifications des conditions physiologiques chez l'homme, les animaux ou les plantes ;
- le bien-être des animaux et l'amélioration des conditions de production des animaux élevés à des fins agronomiques.

C - L'une des finalités visées au point précédent (B) lors de la mise au point, de la production ou des essais de qualité, d'efficacité et d'innocuité de médicaments à usage

humain ou vétérinaire, de denrées alimentaires, d'aliments pour animaux et d'autres substances ou produits.

D - La protection de l'environnement naturel dans l'intérêt de la santé ou du bien-être de l'homme ou de l'animal.

E- La recherche en vue de la conservation des espèces.

F- L'enseignement supérieur, ou la formation professionnelle ou technique conduisant à des métiers qui comportent la réalisation de procédures expérimentales sur des animaux ou les soins et l'entretien de ces animaux, ainsi que la formation professionnelle continue dans ce domaine.

G - Les enquêtes médico-légales.

4.2 Nombre de procédures expérimentales :

4.2.1 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 1 :

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITÉ (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) :

- classe légère
- classe modérée
- classe sévère
- classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- Pertinence et justification de la procédure expérimentale :

- Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :

- Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

- Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications - anesthésiques, analgésiques,

anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

- Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

- mise à mort ?

précisez les animaux concernés :

- animal gardé en vie ?

précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

- placement ou mise en liberté des animaux ?

précisez les animaux concernés :

4.2.2 NOM DE LA PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE N° 2 :

- PROPOSITION DE CLASSIFICATION DE LA PROCÉDURE SELON LE DEGRÉ DE SÉVÉRITÉ (conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet) :

- classe légère
- classe modérée
- classe sévère
- classe sans réveil

- Description détaillée de la procédure expérimentale :

- Pertinence et justification de la procédure expérimentale :

- Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lots, et les justifier :

- Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés :

- Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

- Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation à l'anesthésie des animaux :

- Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

- Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

- Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale :

- mise à mort ?

précisez les animaux concernés :

- animal gardé en vie ?
précisez les animaux concernés et si la décision a été prise par le vétérinaire
ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet :

- placement ou mise en liberté des animaux ?
précisez les animaux concernés :



4.3. Si le projet utilise des animaux réutilisés d'un projet antérieur :

- GRAVITÉ RÉELLE DES PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES ANTÉRIEURES

:

- légère
 modérée
 sévère

Précisez les éléments scientifiques justifiant la demande de dérogation pour
autant que les animaux n'aient pas été utilisés plus d'une fois dans une
procédure expérimentale entraînant une douleur intense, de l'angoisse ou une
souffrance équivalente :

- Effet cumulatif de cette réutilisation sur les animaux :

- L'avis vétérinaire est-il favorable en prenant en considération le sort de l'animal
concerné sur toute sa durée de vie ? **Ooui Onon**

- L'animal réutilisé a-t-il pleinement recouvré son état de santé et de bien-être
général ? **Ooui Onon**

4.4. Cas particulier des projets contenant une procédure expérimentale impliquant une douleur, une angoisse ou une souffrance sévère et susceptible de se prolonger sans qu'il soit possible de les soulager

- De quelle(s) procédure(s) expérimentale(s) du projet s'agit-il ?

- Justifiez scientifiquement les raisons à l'origine d'une demande de dérogation :

Titre : Rôle des sARN dans la pathogénie d'*Enterococcus faecium*

Mots clés : sARN, *Enterococcus faecium*, pathogénie

Résumé : *Enterococcus faecium* est une bactérie commensale du tube digestif de l'homme, pathogène opportuniste multi-résistant aux antibiotiques et responsable d'épidémies hospitalières. L'existence d'ARN régulateurs chez *E. faecium* (Ern) ayant récemment été découverte, ce travail de thèse avait pour objectif d'évaluer leur implication *in vivo*. Un modèle de colonisation a été mis au point chez la souris, à partir de plusieurs modèles décrits dans la littérature. Ils ont été comparés, et un nouveau modèle associant la ceftriaxone et l'amoxicilline a été développé. L'ARN régulateur Ern0160 a ensuite été étudié. Quatre souches d'*E. faecium* ont été utilisées, Aus0004 (WT), la souche mutante WT délétée d'*ern0160* (Δ 0160), la souche Δ 0160 trans-complémentée surexprimant *ern0160* (Δ 0160_0160), et la souche Δ 0160 contenant le vecteur pAT29 vide (Δ 0160_pAT29). Dans les expériences *in vitro*, aucune différence n'a été observée entre les souches WT et Δ 0160 cultivées seules, tandis que la souche Δ 0160_0160 s'est développée plus lentement que Δ 0160_pAT29. *In vivo*, aucune différence significative de colonisation n'a été observée avec les souches inoculées seules. Dans les essais de compétition *in vitro* et *in vivo*, la souche WT était prédominante par rapport à la souche délétée Δ 0160. Avec la suspension « Δ 0160_0160 + Δ 0160_pAT29 », la souche Δ 0160_pAT29 était prédominante, suggérant un effet délétère de la surexpression d'*ern0160*. Ces résultats suggèrent l'implication d'Ern0160 dans la colonisation intestinale par *E. faecium*. Des modèles d'infection (endocardite infectieuse et bactériémie secondaire à une translocation intestinale) ont été développés au cours de ce travail mais restent à finaliser.

Title : sRNA and *Enterococcus faecium* pathogenesis

Keywords : sRNA, *Enterococcus faecium*, pathogenesis

Abstract : *Enterococcus faecium* is a normal inhabitant of the human gut intestinal tract (GIT) and an opportunistic pathogen multi-resistant to antibiotics and responsible for hospital outbreaks. Since the existence of regulatory RNAs in *E. faecium* (Ern) has been recently discovered, the aim of this study was to evaluate their involvement *in vivo*. A murine GIT colonization model was developed, based on several published models that were compared, and a new one combining ceftriaxone and amoxicillin was developed. Then, the regulatory RNA Ern0160 was studied. Four *E. faecium* strains were used, Aus0004 (WT), an *ern0160*-deleted Aus0004 mutant (Δ 0160), a *trans*-complemented Δ 0160 strain overexpressing *ern0160* (Δ 0160_0160), and a strain Δ 0160 with an empty pAT29 vector (Δ 0160_pAT29). In *in vitro* experiments, no difference was observed between WT and Δ 0160 strains cultured individually while Δ 0160_0160 strain grew more slowly than Δ 0160_pAT29. In competitive assays, the WT strain was predominant compared to the deleted strain Δ 0160 at the end of the experiment. A GIT colonization was performed with each strain alone and no significant difference was noticed. By contrast, significant results were obtained with co-colonization experiments. With WT + Δ 0160 suspension, a significant advantage for the WT strain was observed, suggesting the involvement of *ern0160* in GIT colonization. With Δ 0160_0160 + Δ 0160_pAT29 suspension, the strain with the empty vector took the advantage from day 3 to the end of the protocol, suggesting a deleterious effect of *ern0160* overexpression. Altogether, these findings demonstrate the potential implication of Ern0160 in GIT colonization of *E. faecium*. Infection models have also been developed during this work but remain to be finalized.