



HAL
open science

Rôles d'ARN régulateurs exprimés par *Enterococcus faecium* et *Staphylococcus aureus* en réponse au stress antiseptique

Loren Dejoies

► **To cite this version:**

Loren Dejoies. Rôles d'ARN régulateurs exprimés par *Enterococcus faecium* et *Staphylococcus aureus* en réponse au stress antiseptique. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2022. Français. NNT : 2022REN1B044 . tel-03958126

HAL Id: tel-03958126

<https://theses.hal.science/tel-03958126v1>

Submitted on 26 Jan 2023

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

Loren DEJOIES

Rôles d'ARN régulateurs exprimés par *Enterococcus faecium* et *Staphylococcus aureus* en réponse au stress antiseptique.

Thèse présentée et soutenue à l'Université de Rennes 1, le 6 octobre 2022

Unité de recherche : Inserm U1230 BRM (Bacterial RNAs & Medicine)

Rapporteurs avant soutenance :

Jean-Yves MAILLARD Professor – Cardiff University
Pascale SERROR Directeur de Recherche – INRAE

Composition du Jury :

Président : Olga SOUTOURINA

Examineurs : Jean-Yves MAILLARD Professor – Cardiff University
Pascale SERROR Directeur de Recherche – INRAE
Vincent DUBEE PU-PH – Université d'Angers
Olga SOUTOURINA PU – Université Paris Saclay

Dir. de thèse : Vincent CATTOIR PU-PH – Université de Rennes 1

Invité(s) Reynald GILLET PU – Université Rennes 1

REMERCIEMENTS

« Les étoiles sont éclairées pour que chacun puisse un jour retrouver la sienne »

Le Petit Prince – Antoine de Saint-Exupéry

J'adresse mes remerciements les plus sincères :

- Aux membres du jury, Pr. Dubée, Pr. Maillard, Pr. Soutourina et Mme Serron d'avoir accepté de juger ce travail et de participer à cette soutenance,
- Aux membres de mon Comité de suivi de thèse, Pr. Eveillard et Pr. Naas et à son président le Pr. Reynald Gillet pour leur bienveillance et leurs conseils qui ont fait évoluer ce projet,
- Au Pr. Vincent Cattoir pour m'avoir proposé cet épineux défi de conjuguer pratique hospitalière et travail approfondi de recherche au cours de ces 4 années d'Assistanat Hospitalo-Universitaire. Merci de ta bienveillance et de tes avis éclairés.

Je tiens également à remercier toute l'équipe Inserm U1230 pour leur accueil et leur aide technique et logistique.

Un merci particulier à Valérie, Svetlana, Marie-Laure et Nathalie, précieuses guides de terrain pour leur aide, leur solidarité, leur disponibilité et leur écoute. J'ai une pensée pour le Pr. Brice Felden, qui m'a accueillie dans son laboratoire de recherche et a permis à ce projet d'aboutir.

Merci à Killian et Sophie, la « Vingt Centimes » maintenant dissoute mais indélébile dans mon esprit. Vous partis et moi seule restante, je me suis sentie un peu décrépie parmi tous ces jeunes, il était temps que je passe du côté des diplômés ! Merci pour votre disponibilité, votre aide à l'intérieur et à l'extérieur de l'unité, pour ces échanges scientifiques entérococciques, parfois de haute volée, parfois pas... et surtout pour tout le reste. Je vous souhaite tout le meilleur. Merci également à Guillaume pour cette amitié vieille de presque 10 ans !

Un grand merci à mes consœurs et confrères hospitaliers pour m'avoir accompagnée à leur manière au cours de ces 4 années. Je n'ai pas de répertoire de synonymes assez grand pour saluer toutes les belles personnes côtoyées depuis le début de cette aventure.

Merci à mes parents et ma sœur pour ce merveilleux quatuor et la symbiose breizho-occitano-catalane que nous formons.

A Edouard, Charlie et aux étoiles sur qui repose le solide socle de ma vie.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	4
ABREVIATIONS UTILES	8
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES TABLEAUX	11
LISTE DES FOURNISSEURS.....	12
AVANT-PROPOS	13
Deux pathogènes opportunistes Gram positif.....	15
1. L'un en surface, <i>S. aureus</i>	15
1.1. Généralités	15
1.2. Pouvoir pathogène et données épidémiologiques	15
1.3. Résistance aux antibiotiques	17
1.4. Arsenal de virulence	18
2. L'autre en profondeur, <i>E. faecium</i>	19
2.1. Généralités	19
2.2. Pouvoir pathogène et données épidémiologiques	20
2.3. Arsenal de résistance	22
2.4. Facteurs de virulence	23
2.5. Génétique des populations de <i>E. faecium</i>	25
Antiseptiques et désinfectants.....	26
1. Définitions et principales familles.....	26
2. Mécanismes d'action et usage des molécules étudiées	27
2.1. La chlorhexidine	28
2.2. La povidone iodée (PVP-I), ou Bétadine®.....	30
2.3. Le chlorure de benzalkonium.....	31
2.4. Le triclosan	32
3. Résistance aux antiseptiques	33
3.1. Définitions : résistance, sensibilité diminuée, tolérance.....	33
3.2. Résistance naturelle et résistance acquise.....	34
3.3. Conséquences en pratique clinique ?.....	37
3.4. Comment la détecter ?	38
Les ARN régulateurs	39
1. Définitions et modes d'action.....	39
2. sARN et <i>S. aureus</i>	41

2.1.	ARNIII.....	41
2.2.	SprD.....	41
2.3.	SprC.....	42
2.4.	SprB.....	42
2.5.	SprX.....	42
2.6.	SprF1.....	43
3.	sARN et <i>E. faecium</i>	43
	Synthèse comparative.....	45
	PROJET DE RECHERCHE.....	47
	AXE N°1 : ETUDE DE L'ACTIVITE DES ANTISEPTIQUES SUR <i>S. aureus</i> ET <i>E. faecium</i>	49
	Matériels et méthodes.....	50
1.	Souches bactériennes.....	50
2.	Prérequis des tests sur antiseptiques.....	51
2.1.	Solubilité.....	53
2.2.	Stabilité.....	53
3.	Vérification de l'efficacité aux concentrations d'usage.....	54
3.1.	Principe.....	54
3.2.	Préparation des inocula.....	55
3.3.	Préparations des solutions.....	55
3.4.	Déroulement du protocole.....	56
3.5.	Critères d'évaluation de l'essai.....	56
4.	Détermination des CMI, CMB et CSI.....	57
5.	Vitesse de bactéricidie de la chlorhexidine.....	57
	Résultats.....	59
1.	Bactéricidie efficace sur critères de la norme NF EN 13727.....	59
2.	CMI, CMB, CSI et vitesse de bactéricidie.....	59
	AXE N°2 : ETUDE DE L'IMPACT DU STRESS ANTISEPTIQUE SUR LA REPOSE MEDIEE PAR LES sARN.....	61
	Présentation de l'article n°1.....	62
1.	Article n°1, Scientific Reports, 2021.....	63
2.	Informations supplémentaires.....	74
2.1.	Validité du gène de ménage <i>adk</i>	74
2.2.	Note supplémentaire de discussion.....	74
	Analyses complémentaires.....	75
1.	Recherche d'induction de résistance à la vancomycine.....	75

2.	Analyse transcriptomique globale par RNA-seq	76
2.1.	Matériels et méthodes	76
2.1.1.	Echantillons testés, conditions de culture et extraction des ARN	76
2.1.2.	Librairies, séquençage et analyse statistique	77
2.2.	Résultats et discussion	77
2.2.1.	Qualité des données RNA-seq	77
2.2.2.	Effet des CSI d'antiseptique sur les sARN.....	78
2.2.3.	Autres impacts.....	78
3.	Rôle de transporteurs ABC dans la réponse au stress antiseptique.....	79
3.1.	Matériels et méthodes	79
3.2.	Résultats et discussion.....	80
3.2.1.	Environnement génétique et analyse des séquences protéiques.....	80
3.2.2.	Expression en gradient antiseptique.....	81
	AXE N°3 ÉTUDE DE l'Ern0160.....	84
	Contexte.....	85
	Matériels et méthodes	85
1.	Souches	85
2.	Recherche de variations phénotypiques.....	85
2.1.	Profils de croissance	85
2.2.	Ern0160 et antibiotiques.....	86
3.	Recherche de cibles.....	86
3.1.	Prédictions <i>in silico</i> sans a priori.....	86
3.2.	Etude transcriptomique.....	86
3.2.1.	RNA-seq.....	86
3.2.2.	RT-qPCR.....	87
4.	Validation expérimentale des cibles directes.....	87
4.1.	Retard sur gel.....	87
4.2.	Système rapporteur à double plasmide	87
4.2.1.	Constructions plasmidiques et clonages.....	88
4.2.2.	Préparation des phages pour transduction.....	89
	Résultats et discussion.....	90
1.	Ern0160 avec et sans stress antimicrobiens	90
2.	Présentation de l'article n°2.....	91
3.	Analyses supplémentaires.....	114
3.1.	Système rapporteur à double plasmide	114

3.1.1. Mise en échec du système pour les cibles directes de l'Ern0160	114
3.1.2. Mise en échec du système pour la cible Efmqr	115
3.2. Transcriptome d'Aus0004 en fonction de l'expression de <i>ern0160</i>	116
3.2.1. Analyse globale RNA-seq.....	116
3.2.2. Focus sur EFAU004_02176	117
3.3. Comparaison RNA-seq et RT-qPCR pour les souches prédites <i>in silico</i>	118
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	120
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	124
ANNEXES	134

ABREVIATIONS UTILES

ABC : ATP-Binding Cassette

AFNOR : Association Française de Normalisation

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

ARNm : ARN messenger

BC : chlorure de benzalkonium ('Benzalkonium Chloride')

BHI : 'Brain-Heart Infusion'

CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CC17 : Complexe Clonal 17

CH : Chlorhexidine (digluconate)

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CSI : Concentration SubInhibitrice

ERV : *Enterococcus faecium* Résistant à la Vancomycine

Ern : '*Enterococcus* RiboNucleic acid'

ES : Début de phase stationnaire ('Early Stationary phase')

EUCAST : 'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing'

FDA : 'Federal Drug Administration'

IAS : Infection Associée aux Soins

LE : Fin de phase exponentielle ('Late Exponential phase')

LPS : LipoPolySaccharide

MATE : 'Multidrug And Toxic compound Extrusion'

ME : Milieu de phase exponentielle ('Mid Exponential phase')

MFS : 'Major Facilitator Superfamily'

MH2 : Milieu de Mueller-Hinton ajusté en calcium

MLST : 'Multi-Locus Sequence Typing'

MSCRAMM : 'Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecule'

OR : Odds Ratio

PK/PD : Pharmacocinétique / Pharmacodynamie

PLP : Protéine Liant les Pénicillines

PTS : 'PhosphoTransferase System'
PVP-I : PolyVinylPyrrolidone Iodée (Bétadine®)
RBS : 'Ribosome Binding Site'
RCP : Résumé des Caractéristiques du Produit
RIN : 'RNA Integrity Number'
RND : 'Resistance-Nodulation cell Division'
SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline
sARN : ARN régulateur
SASM : *S. aureus* Sensible à la Méricilline
SCCmec : 'Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*'
SERAM : 'Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecule'
SFM : Société Française de Microbiologie
SMR : 'Small Multidrug Resistance'
Spr : 'Small Pathogenicity island RNA'
TIR : Site d'Initiation de la Traduction ('Translation Initiation Region')
TRI : Triclosan
TS : Milieu Trypticase-Soja
UFC : Unité Formant Colonie

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Mécanismes de transmission de <i>S. aureus</i> en ville et à l'hôpital et principaux sites infectieux, adapté de Sakr <i>et al.</i> (9).....	17
Figure 2 : Evolution de la prévalence des souches invasives de SARM issues de bactériémies en Europe entre 2005 et 2020.....	18
Figure 3 : Évolution simplifiée des Eucaryotes aux cours des ères géologiques, issu de Van Tyne & Gilmore (27).	20
Figure 4 : Mécanismes de transmission hospitalière, adapté de Arias & Murray (33).	21
Figure 5 : Histoire évolutive des entérocoques, adapté de Garcia-Solache et Rice (32).....	23
Figure 6 : Evolution de la prévalence des souches invasives d'ERV issues de bactériémies en Europe entre 2005 et 2020	24
Figure 7 : Représentation schématique des 5 grandes classes de pompes d'efflux et leurs principaux substrats, issu de Russel <i>et al.</i> (71).	36
Figure 8 : Principales régulations post-transcriptionnelles issues de l'interaction sARN-ARNm, issu de Svensson et Sharma (92).....	40
Figure 9 : Northern-Blot validant 10 sARN candidats exprimés par <i>E. faecium</i> , issu de Sinel <i>et al.</i> (110).....	44
Figure 10 : Fréquences de publications scientifiques sur les termes Virulence (à gauche) et Résistance (à droite) pour les deux bactéries étudiées avec utilisation du filtre «Human species ».	46
Figure 11 : Protocole de dilution neutralisation pour l'efficacité des antiseptiques, dérivé de la norme NF EN 13727 pour l'évaluation de l'efficacité bactéricide en médecine.	56
Figure 12 : Environnement génétique des gènes d'intérêt EFAU004_02580 et EFAU004_02581.....	80
Figure 13 : Alignement par Clustal 0 (1.2.4) des séquences protéiques pour les transporteurs ABC.....	81
Figure 14 : Expression de EFAU004_02580 sans (en noir) et avec des concentrations croissantes de chlorhexidine digluconate (en bleu) et de chlorure de benzalkonium (en rouge).....	83
Figure 15 : Principe de l'étude <i>in vivo</i> par le système à double plasmide avec gène rapporteur, issu de Ivain <i>et al.</i> (106).....	88
Figure 16 : Courbes de croissance des duplicats analysés en RNA-seq pour les 4 souches d' <i>E. faecium</i> , obtenues après lecture manuelles des DO ₆₀₀	90
Figure 17 : Alignement des protéines à domaines LysM codées par les gènes cibles de Em0160.....	115
Figure 18 : Fonctionnement du système anti-oxydant thiorédoxine Trx - TrxR, adapté de Liao <i>et al.</i> (132).	118

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principaux antibiotiques utilisés contre <i>E. faecium</i> et résistances associées, adapté de Garcia-Solache et Rice (32).	22
Tableau 2 : Récapitulatif des facteurs de virulence retrouvés chez <i>E. faecium</i> ayant été confirmés par expérimentation <i>in vivo</i> , adapté de Goh <i>et al.</i> (41).	24
Tableau 3 : Présentation des principales familles et des spectres d'activité d'antiseptiques et de désinfectants actuels, adapté de Hugo <i>et al.</i> (58).	27
Tableau 4 : Systèmes d'efflux impliqués dans la résistance aux antiseptiques répertoriés chez <i>S. aureus</i> et <i>E. faecium</i>	36
Tableau 5 : Synthèse des principales caractéristiques des deux espèces bactériennes étudiées	45
Tableau 6 : Récapitulatif des souches et des essais réalisés pour la caractérisation globale de l'action des antiseptiques sélectionnés.	52
Tableau 7 : Principales caractéristiques physico-chimiques des antiseptiques sélectionnés.	53
Tableau 8 : Concentrations d'usage et de l'essai de dilution – neutralisation pour les solutions antiseptiques. ..	55
Tableau 9 : Composition de la solution neutralisante universelle et effet attendu de chacun des constituants ..	55
Tableau 10 : Critères de validation de l'essai de bactéricidie d'un antiseptique selon les normes NF EN 1276 et 13727.	57
Tableau 11 : Récapitulatif des résultats de CMI et CSI déterminées pour les souches de <i>S. aureus</i> et <i>E. faecium</i>	60
Tableau 12 : Comparatif synthétique des résultats obtenus en RT-qPCR et RNA-seq pour les cibles sélectionnées.....	119

LISTE DES FOURNISSEURS

Antiseptiques

CHLORHEXIDINE DIGLUCONATE (PHR1294) : Sigma-Aldrich

CHLORURE DE BENZALKONIUM \geq 95% (12060) : Sigma-Aldrich

PVP-IODEE (PVP1) : Sigma-Aldrich

TRICLOSAN/IRGASAN (PHR1338) : Sigma-Aldrich

Milieux de culture

MILIEU TRYPTICASE-SOJA : Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis

MILIEU *BRAIN-HEART INFUSION* : Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis

MILIEU MH ajusté en calcium (MH2) : Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis

AVANT-PROPOS

Les espèces bactériennes *Enterococcus faecium* et *Staphylococcus aureus* représentent de véritables « success stories » dans le monde hospitalier avec la diffusion de clones épidémiques et à haut potentiel de résistance aux antibiotiques. Pour ces raisons, ces deux espèces sont les représentantes des bactéries à Gram positif au sein du groupe de pathogènes 'ESKAPE' (*E. faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter* spp.) qui constituent des modèles de pathogénie à hautes capacités de transmission et de résistance aux antibiotiques [1]. Dans l'objectif de prévention de ces épisodes épidémiques, des règles d'hygiène hospitalière sont mises en œuvre en portant à la fois sur les notions d'antisepsie des patients et des soignants (solutés hydroalcooliques, antiseptiques topiques) et de désinfection du matériel et des surfaces inertes. Devant cette probable cohabitation entre biocides, regroupant antiseptiques et désinfectants, et pathogènes nosocomiaux dans les structures de soins, il paraissait pertinent de s'intéresser à l'impact d'un stress de biocides (faibles concentrations mimant les concentrations résiduelles présentes après utilisation) sur les phénomènes d'émergence de tolérance voire de résistance vis-à-vis des antiseptiques et des antibiotiques. Du fait des capacités d'adaptation de *E. faecium* et de *S. aureus* à des environnements variés et parfois défavorables, nous avons souhaité évaluer le rôle de leurs ARN régulateurs (sARN) dans un contexte de stress antiseptique. Un grand nombre d'informations sur les sARN est déjà disponible chez *S. aureus* mais leur existence chez *E. faecium* a été rapportée seulement depuis 2017 et de nombreuses inconnues persistent encore quant à leurs réseaux de régulation. Ce travail de thèse s'inscrit dans le contexte de l'étude des interrelations liant ce trio constitué des pathogènes nosocomiaux à Gram positif *S. aureus* et *E. faecium*, des antiseptiques d'usage courant et des sARN.

La première partie de ce manuscrit sera consacrée à une revue de la littérature posant l'état des connaissances actuelles sur les trois protagonistes regroupés dans cette thèse. Dans un premier temps, nous aborderons les caractéristiques générales de *S. aureus* et *E. faecium*, toutes deux bactéries commensales et

opportunistes, pour ensuite aborder une des armes dont nous disposons pour prévenir les infections qu'elles occasionnent, les antiseptiques. Enfin, les généralités sur les sARN seront rapidement abordées avant d'approfondir ceux impliqués dans ce travail. La seconde partie détaillera les expérimentations et les résultats obtenus et sera divisée en trois axes dont les résultats ont fait l'objet de deux publications scientifiques, l'une en 2021 et l'autre en cours de soumission en 2022. Enfin, les perspectives qui découlent de ce projet seront discutées.

Deux pathogènes opportunistes Gram positif

Staphylococcus aureus et *Enterococcus faecium* sont des bactéries d'intérêt majeur en médecine humaine. A l'échelle mondiale, ces deux espèces sont responsables d'épidémies d'infections associées aux soins (IAS) dues à la diffusion de clones parfaitement adaptés à l'environnement hospitalier et pour lesquelles le recours aux dernières lignes de traitement antibiotique peut être nécessaire [1].

1. L'un en surface, *S. aureus*

1.1. Généralités

Le genre *Staphylococcus* appartient à l'embranchement des Firmicutes et regroupe aujourd'hui plus de 60 espèces. Les staphylocoques sont des bactéries à Gram positif, aéro-anaérobies facultatives, non sporulées, se présentant sous forme de cocci groupés en amas dits en grappes de raisin. La plupart des souches de *S. aureus* possèdent une capsule polysaccharidique qui leur assure une protection lors de certaines conditions environnementales et qui constitue un facteur de virulence à part entière parmi l'arsenal disponible détaillé ci-après [2]. *S. aureus* est une bactérie non exigeante pour des conditions de croissance optimales entre 30 et 37°C à pH 7,0-7,5 et est également capable de s'adapter à des environnements plus rigoureux [3]. Chez l'homme, les staphylocoques, dont *S. aureus*, sont des bactéries commensales du microbiote cutané. Le site de portage préférentiel de *S. aureus* est le nez et concerne environ 30% de la population [4]. *S. aureus* est également fréquemment retrouvé en portage au niveau des aisselles, du périnée ainsi qu'au sein des microbiotes digestif et vaginal [5,6].

1.2. Pouvoir pathogène et données épidémiologiques

S. aureus est responsable d'une grande diversité d'infections chez l'homme qui peuvent être de bénignes à sévères voire mortelles et qui sont classiquement de deux types distincts : les infections suppuratives et les affections toxiques. Au cours de ces dernières, la pathogénie de *S. aureus* est directement liée à l'action de toxine qu'il produit et non à sa seule prolifération. Ces toxines peuvent être préformées dans un aliment contaminé qui une fois ingéré provoquera une toxi-infection alimentaire, ou être sécrétées *in situ* chez l'hôte et provoquer

des tableaux cliniques sévères tels que le syndrome du choc toxique staphylococcique [7]. La physiopathologie des infections suppuratives est liée à la multiplication de *S. aureus* chez l'hôte et à l'expression de facteurs de virulence responsables de l'invasion voire de la destruction des tissus. Ces infections suppuratives peuvent être superficielles et bénignes (impétigo, abcès sous-cutanés, furoncles) ou profondes et sévères (bactériémie, endocardite infectieuse, infections ostéo-articulaires, pneumonies). En plus de ces éléments dépendant du pathogène, la réponse de l'hôte occupe un rôle majeur expliquant la gravité de certaines situations [8].

Dans le contexte de la survenue d'infections associées aux soins, *S. aureus* est essentiellement transmis par manuportage (Figure 1) [5,9]. D'après les derniers chiffres disponibles, en 2017, *S. aureus* était le 2^{ème} agent pathogène le plus fréquemment impliqué dans les IAS en France avec 13,8% du total, juste derrière *Escherichia coli* (23,6%). La communauté scientifique s'intéresse de près à la notion de portage car il est désormais démontré que la colonisation par *S. aureus* augmente significativement le risque d'infection ultérieure par souche endogène, notamment pour les bactériémies [10,11]. Pour cette raison, un dépistage actif des porteurs associé à une décolonisation nasale et cutanée en pré-opératoire est indiquée dans certaines chirurgies, notamment cardiaques [12]. De plus, une étude américaine récente a montré que la poursuite du protocole de décolonisation jusqu' à 6 mois après la sortie de l'hôpital permettait une réduction de 44% des infections à SARM chez des patients connus porteurs [13]. Cette décolonisation consiste le plus souvent en une association antibiotique/antiseptique avec application intranasale de pommade à la mupirocine associée à une toilette corps entier au savon contenant de la chlorhexidine et à des bains de bouche [12,14].

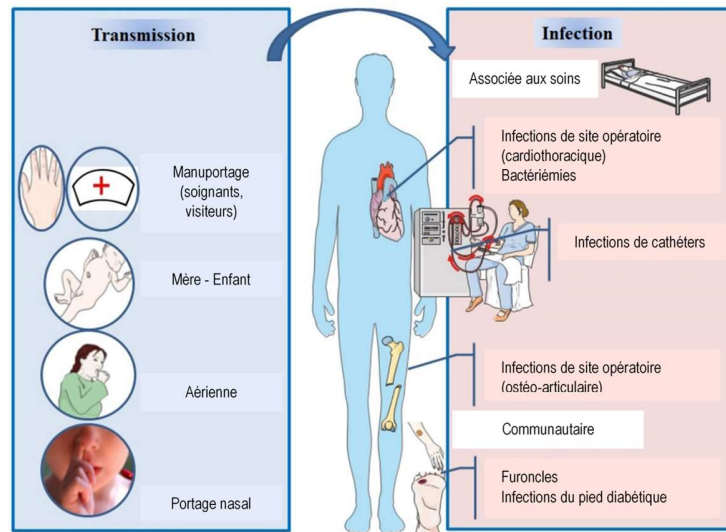


Figure 1 : Mécanismes de transmission de *S. aureus* en ville et à l'hôpital et principaux sites infectieux, adapté de Sakr et al. (9).

1.3. Résistance aux antibiotiques

La première question à se poser pour la thérapeutique des infections à *S. aureus* est la caractérisation de la souche par rapport à un antibiotique marqueur, la méticilline, qui distingue donc les souches sensibles (*Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline, SASM) ou résistantes (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, SARM). En effet, cette résistance, médiée par le gène *mecA* (plus rarement *mecC*) constitue le mécanisme de résistance de *S. aureus* le plus important étant donné qu'il rend inutilisable la quasi-totalité des β -lactamines traditionnelles (pénicilline, céphalosporines de 1^{ère} à 4^{ème} générations et carbapénèmes). Le gène *mecA* code pour une protéine de liaison aux pénicillines (PLP) de faible affinité appelée PLP2a et est localisé sur un élément génétique mobile chromosomique appelé 'Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*' ou *SCCmec* qui peut héberger des gènes de résistance à d'autres classes d'antibiotiques [15]. Au début des années 1980, les souches de SARM ont émergé et largement diffusé en contexte nosocomial et concerne actuellement 40 à 80% des souches de *S. aureus* responsables d'infections nosocomiales aux Etats-Unis [16]. En Europe, les données sont très hétérogènes et de tendance stable ou décroissante entre 2000 et 2020. En France, la prévalence des SARM est moins alarmante qu'aux Etats-Unis avec 9,1% et 13,4% des souches communautaires et hospitalières, respectivement [17]. Concernant les souches invasives isolées de bactériémies, la proportion de SARM est dans la tranche 10-25%, stable depuis 2015 (Figure 2).

Parmi l'arsenal thérapeutique disponible pour le traitement des infections à SARM, la vancomycine, le linézolide et la daptomycine sont les principales molécules recommandées. Malgré l'existence de difficultés pratiques (modalités d'administration contraignantes, existence de résistance), elles restent indispensables du fait de la gravité des infections invasives à SARM qui sont grevées d'un sur-risque de mortalité (OR 1,93) [18]. De nouvelles molécules à visée « anti-SARM » sont disponibles avec un recul d'utilisation toutefois encore insuffisant [19].

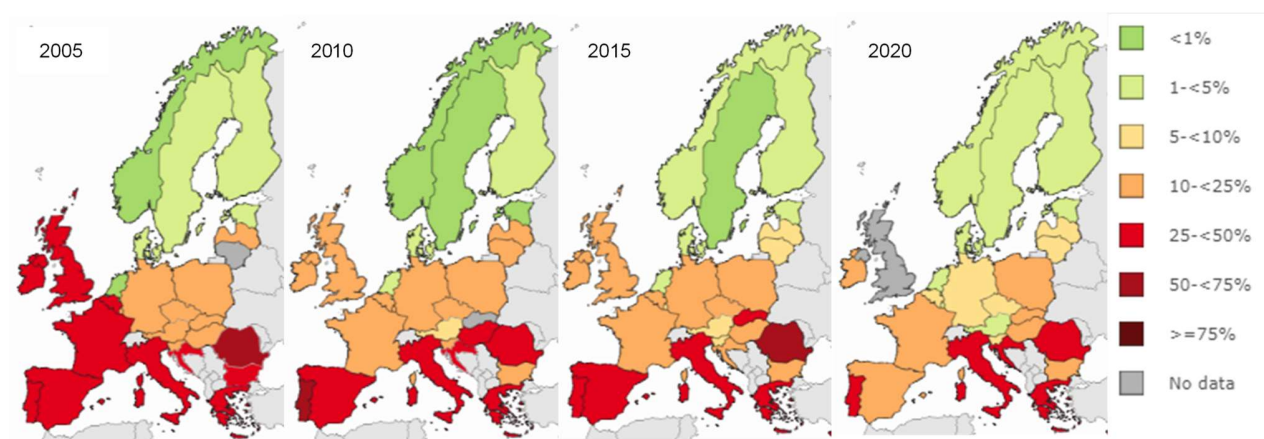


Figure 2 : Evolution de la prévalence des souches invasives de SARM issues de bactériémies en Europe entre 2005 et 2020 (ECDC Atlas <http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>)

1.4. Arsenal de virulence

La diversité des infections provoquées par *S. aureus* est issue d'un pouvoir pathogène lié à la synthèse de nombreux facteurs de virulence qui ne seront pas détaillés dans ce travail de thèse. Brièvement, ces facteurs de virulence interviennent à des étapes-clés pour la survenue d'une infection depuis la phase d'adhésion jusqu'à la phase d'invasion, en passant par l'échappement au système immunitaire de l'hôte, l'acquisition de nutriments, la survie intracellulaire et la compétition avec d'autres microorganismes. Ainsi, plus d'une centaine de facteurs de virulence ont déjà été décrits chez *S. aureus* avec une répartition en trois grandes catégories : les composants de surface, les protéines de surfaces, incluant les MSCRAMMs ('microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules') et les protéines sécrétées incluant les SERAMs ('secretable expanded repertoire adhesive molecules') [20,21]. Certains de ces facteurs de virulence peuvent être impliqués dans plusieurs étapes parmi celles citées précédemment et concourent à la complexité de la physiopathologie des infections à *S. aureus*.

La virulence de *S. aureus* ne sera pas davantage détaillée dans ce travail de thèse. En effet, la thématique initiale ne s'inscrivant pas au sein de ce sujet complexe et difficilement simplifiable, une revue exhaustive serait hors de propos. Le cas échéant, les publications scientifiques de Tam K. et Torres VJ ainsi que de Foster *et al.* offriront une synthèse exhaustive de qualité [20,21].

2. L'autre en profondeur, *E. faecium*

2.1. Généralités

Le genre *Enterococcus* appartient à l'embranchement des Firmicutes et regroupe aujourd'hui plus de 50 espèces [22]. Les entérocoques sont des bactéries à Gram positif, aéro-anaérobies facultatives, non sporulées, non capsulées se présentant sous forme de cocci groupés en diplocoques ou en courtes chaînettes. Longtemps assimilés au genre *Streptococcus* par leur morphologie, ils s'en distinguent toutefois par leur formidable capacité à maintenir leur croissance sous une palette très diverse de conditions défavorables : température (de 8°C à 45°C), pH (de 4,8 à 9,6), hypersalinité (6,5% de NaCl), présence de sels biliaires, dessiccation, ... [23,24]. De plus, cet état déjà robuste peut être renforcé si des conditions sub-léthales (*i.e.* insuffisantes pour tuer la bactérie) ont été appliquées rendant alors les entérocoques capables de survivre à des conditions encore plus drastiques. Par exemple, une préexposition en milieu hyperosmotique (NaCl à 6,5%) permet d'augmenter la survie en présence de détergents, d'éthanol ainsi qu'à des températures normalement létales [25]. Cette tolérance croisée inter-stress, portée par la flexibilité métabolique des entérocoques explique l'ubiquité de ce genre bactérien au sein d'autant de niches écologiques. En effet, les entérocoques sont présents dans une grande variété d'habitats (sol, sédiments, eaux douces et océans) et d'hôtes tels que l'homme mais également presque tous les animaux terrestres (mammifères, reptiles, oiseaux et insectes) (Figure 3). Enfin, les entérocoques sont isolés dans de nombreux aliments tels que les produits laitiers [26–28]. Du fait de cette distribution assez exhaustive, ils peuvent être tour à tour utiles (marqueurs fiables de contamination fécale [29]), voire bénéfiques (oncobiotiques [30]) mais aussi délétères lorsque l'équilibre de la commensalité avec l'hôte est altéré et qu'ils se comportent en

authentiques pathogènes opportunistes. Chez l'homme, les entérocoques sont des bactéries commensales du tube digestif et représentent moins de 1% du microbiote intestinal majoritairement constitué de bactéries anaérobies [31].

2.2. Pouvoir pathogène et données épidémiologiques

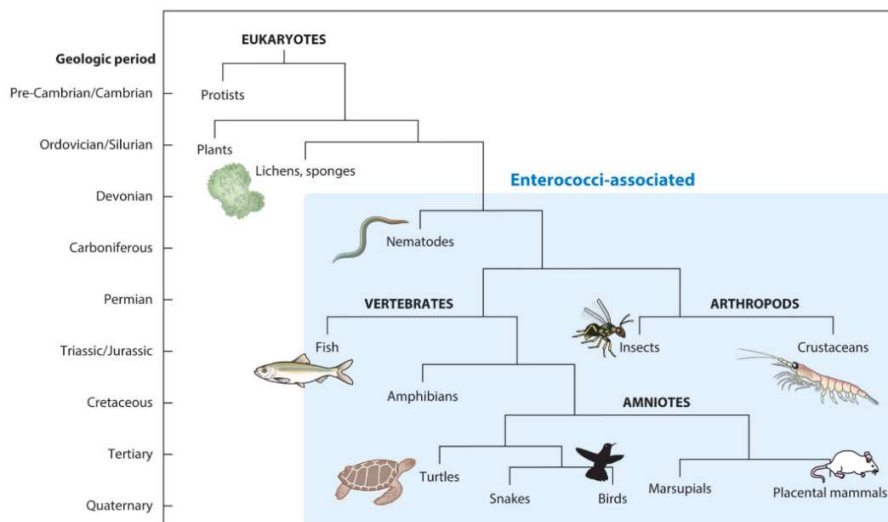


Figure 3 : Évolution simplifiée des Eucaryotes au cours des ères géologiques, issu de Van Tyne & Gilmore (27). Le rectangle bleu représente l'association des différentes espèces animales avec les entérocoques.

Parmi les espèces d'entérocoques identifiées à l'heure actuelle, une dizaine est impliquée en pathologie humaine mais deux espèces (*Enterococcus faecalis* et *E. faecium*) prédominent en comptant pour plus de 95% des infections [32]. *E. faecalis* est le plus fréquemment isolé, dans environ 80% des cas mais la prévalence des infections à *E. faecium* est en augmentation. Malgré des statistiques disproportionnées entre les deux espèces, c'est bien *E. faecium* qui pose actuellement un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale car même s'il paraît moins virulent que *E. faecalis*, ses capacités de résistance aux antimicrobiens lui sont bien supérieures. Sur le plan clinique, les entérocoques sont principalement responsables d'infections des sphères urinaires et abdomino-pelviennes ainsi que de bactériémies et d'endocardites. Du fait de leur arsenal métabolique évoqué plus tôt, les entérocoques sont capables de s'adapter pour persister dans l'environnement hospitalier et sont donc très fréquemment impliqués dans les IAS chez des patients à risque des services de soins intensifs ou en unités de long séjour et/ou immunodéprimés et/ou sous traitement antibiotique prolongé [22,33]. Dans ce cadre, la

contamination se fait alors par transmission manuportée *via* le personnel soignant ou les visiteurs, ou à partir de matériel médical ou de mobilier contaminés (Figure 4) [33]. Aux États-Unis, sur la période 2015-2017, les entérocoques ont été responsables de 14,8% des IAS, *E. faecalis* et *E. faecium* occupant respectivement la 5^{ème} et la 8^{ème} place, contre la 9^{ème} place sur les données 2011-2014 [16,34]. En France, la dernière enquête de prévalence des IAS réalisée en 2017 plaçait *E. faecalis* et *E. faecium* respectivement à la 3^{ème} (6,5%) et à la 11^{ème} (1,5%) position des microorganismes responsables d'IAS. Cette même enquête réalisée en 2012 les plaçait respectivement à la 5^{ème} et à la 16^{ème} position, ce qui objective définitivement l'augmentation de la prévalence de ces infections (+56% et +61% respectivement) [35]. Les données de l'enquête de 2022 sont en cours de saisie et d'analyses mais la tendance à l'augmentation des IAS liées aux entérocoques sera probablement confirmée comme outre-Atlantique.

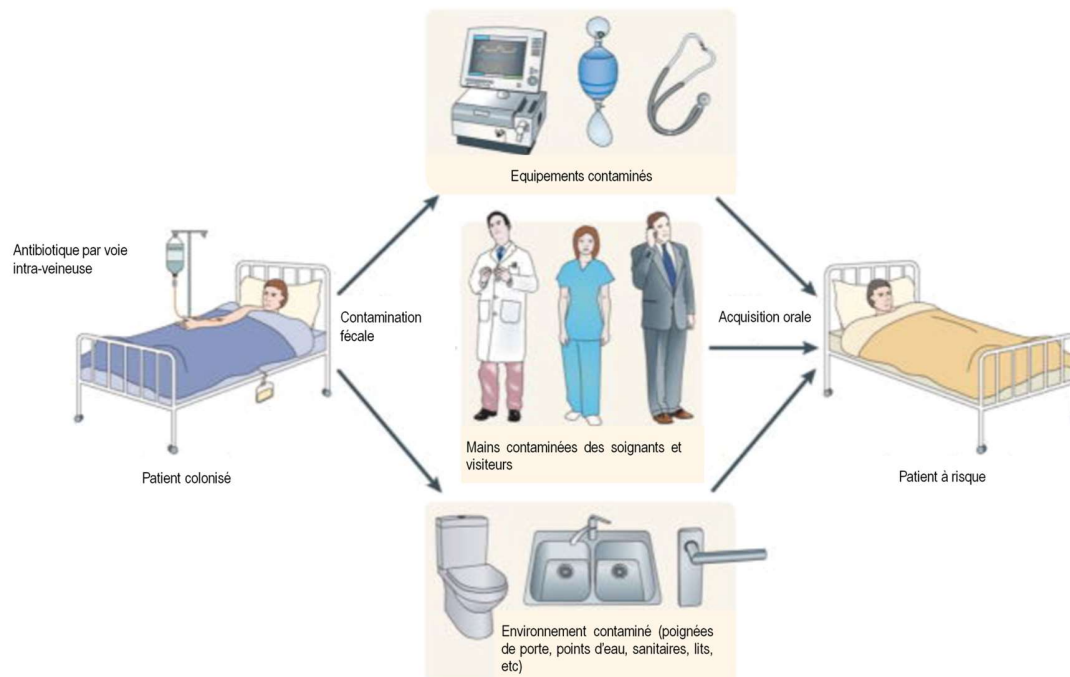


Figure 4 : Mécanismes de transmission hospitalière, adapté de Arias & Murray (33).

2.3. Arsenal de résistance

Les entérocoques présentent naturellement une sensibilité réduite à de nombreux antibiotiques actifs contre d'autres bactéries à Gram positif tels que les streptocoques et les staphylocoques. Parmi les antibiotiques très utilisés en clinique humaine, les entérocoques résistent naturellement aux céphalosporines de 3^{ème} génération (ceftriaxone, céfixime, céfotaxime) et à bas niveau aux aminosides. Les fluoroquinolones ne sont pas considérées comme de bons antibiotiques « anti-entérocoquiques » et l'efficacité *in vivo* des carbapénèmes ne repose actuellement pas sur de nombreuses données. En plus de ces caractéristiques intrinsèques à tous les entérocoques, *E. faecium* peut acquérir des gènes de résistance à de nombreux antibiotiques rendant parfois les infections difficiles à traiter (Tableau 1). Par exemple, une grande majorité (80-90%) des souches d'*E. faecium* a acquis une résistance de haut niveau aux aminopénicillines par modifications qualitatives et/ou quantitatives de la PLP-5 [36].

Tableau 1 : Principaux antibiotiques utilisés contre *E. faecium* et résistances associées, adapté de Garcia-Solache et Rice (32).

Antibiotiques	Principaux déterminants de résistance	Mécanisme de la résistance
β-lactamines	<i>pbp5</i>	Modification de la cible (PLP de faible affinité)
Aminosides (gentamicine)	<i>aac(6')-aph(2'')-Ie, aph(3')-IIIa</i>	Modification de l'antibiotique
Glycopeptides	opéron <i>vanA, vanB</i>	Modification de la cible (précurseur de peptidoglycane)
Daptomycine	<i>liaFSR</i>	Altération de la membrane (polarité, fluidité)
Oxazolidinones (linézolide, tédizolide)	Gènes ADNr 23S <i>optrA, poxtA</i>	Modification de la cible Protection de la cible
Tétracyclines (tigécycline)	<i>tet(M)</i> <i>tet(L)</i> <i>rpsJ</i>	Protection de la cible Efflux actif Modification de la cible
Fluoroquinolones	<i>gyrA, parC</i> <i>Efmqnr</i>	Modification de la cible Protection de la cible

Pour cette raison, la prise en charge des infections dues à ce germe repose 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, des déterminants de résistance ont déjà été décrits [37]. Une chronologie détaillée de l'évolution des infections à *E. faecium*, l'introduction des différents antibiotiques « anti-entérocoquiques » et l'apparition des premières souches résistantes sont synthétisées sur la Figure 5.

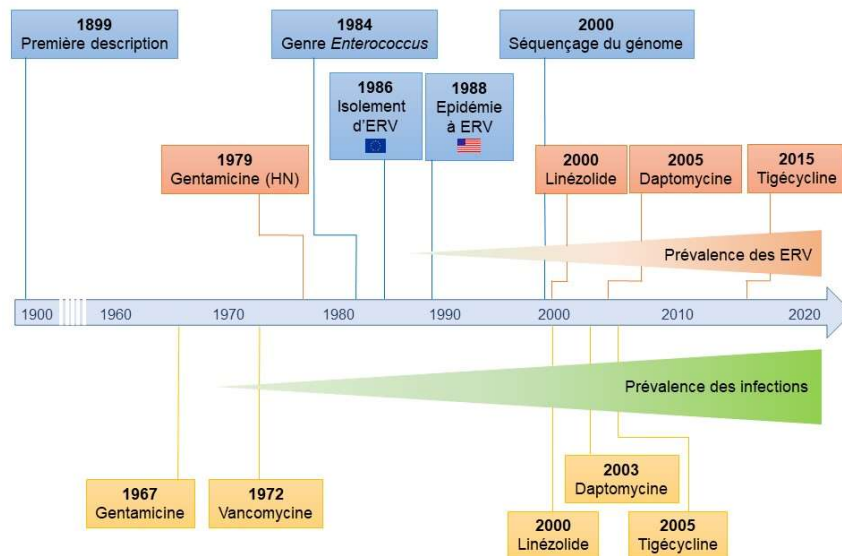


Figure 5 : Histoire évolutive des entérocoques, adapté de Garcia-Solache et Rice (32).

Les événements marquants sont détaillés concernant son rôle de pathogène humain (en bleu), l'apparition des antibiotiques efficaces (jaune) et des résistances qui ont suivi (orange), ERV : *E. faecium* résistant à la vancomycine ; HN : haut niveau de résistance.

Si la tendance à l'augmentation des infections à entérocoques semble relativement homogène à travers le globe, la prévalence de la résistance à la vancomycine est très hétérogène. En effet, bien que les premières souches aient été décrites à la fin des années 1980 au Royaume-Uni et en France, elles ont ensuite largement diffusé à travers le monde, notamment aux États-Unis où les ERV représentent actuellement jusqu'à 80% des souches d'*E. faecium* hospitalières [16,38,39]. En Europe, la prévalence de ces souches est variable entre les pays sans atteindre de telles proportions. En France, la prévalence des ERV reste stable et faible (< 1%) (Figure 6).

2.4. Facteurs de virulence

La pathogénicité d'*E. faecium* est relativement faible comparée à celle de *S. aureus*. Cependant, sa capacité d'adaptation à des conditions environnementales parfois défavorables est basée sur un certain nombre de facteurs de virulence parmi lesquels on distingue comme pour *S. aureus*, les composants de la paroi, les facteurs associés à la paroi et les facteurs sécrétés. De plus, certains systèmes de transports phosphotranférases (PTS) ont également été impliqués dans la virulence de *E. faecium* [40]. En 2017, Goh *et al.* ont publié une synthèse des facteurs de virulence identifiés chez *E. faecalis* et *E. faecium* et validés *in vivo* sur modèle animal. 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* [41] (Tableau 2).

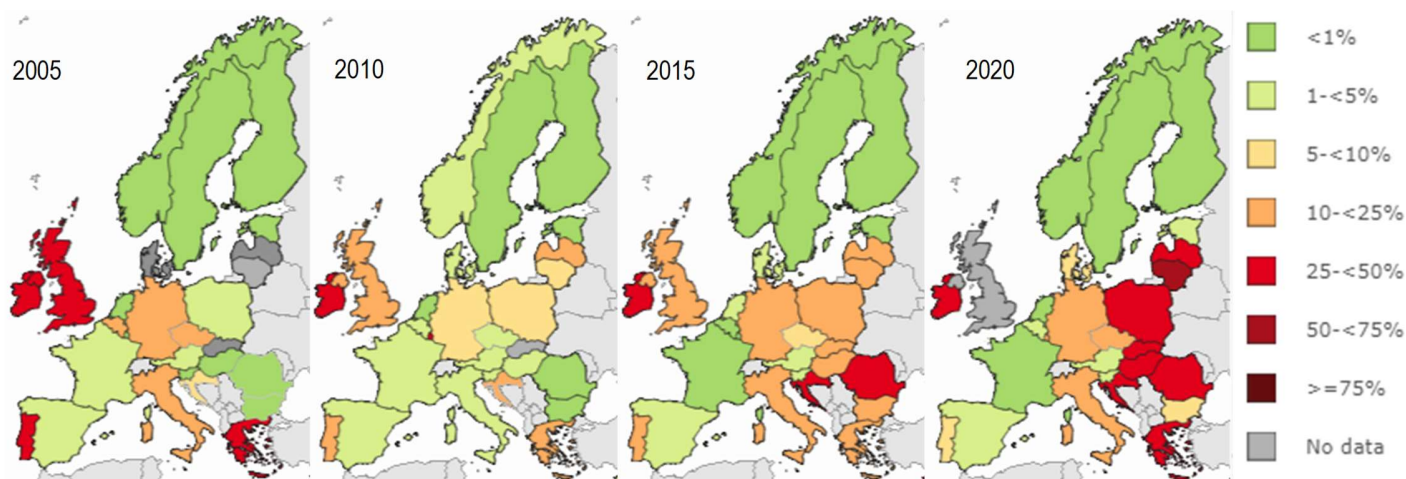


Figure 6 : Evolution de la prévalence des souches invasives d'ERV issues de bactériémies en Europe entre 2005 et 2020 (ECDC Atlas <http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>)

Tableau 2 : Récapitulatif des facteurs de virulence retrouvés chez *E. faecium* ayant été confirmés par expérimentation *in vivo*, adapté de Goh *et al.* (41).

Nom	Classification	Fonctions
Composants de paroi		
<i>capD</i>	capsule	Adhésion, échappement
Facteurs associés à la paroi		
<i>acm</i>	adhésine	adhésion
<i>esp</i>	'enterococcal surface protein'	adhésion
<i>fnm</i>	'Fibronectin-binding protein'	adhésion
<i>ebp/emp</i>	pili	biofilm
Autres		
- Systèmes phosphotransférases		
<i>bepA</i>		biofilm
<i>ptsD</i>		adhésion ?
- Régulateurs transcriptionnels		
<i>asrR</i>	famille MarR	adhésion
<i>ebrB</i>	famille AraC	biofilm
<i>ccpA</i>	-	-
- Fonctions/classification inconnue(s)		
<i>wxl</i>	-	adhésion
<i>gls24-like / glsB-like</i>	protéines de stress	-
<i>hylEfm</i>	hyaluronidase putative	-
<i>zps</i>	'zwitterionic bacterial polysaccharides'	-

2.5. Génétique des populations de *E. faecium*

Avec l'émergence des isolats cliniques d'ERV dans les années 90, la génétique des populations de *E. faecium* a été l'objet de nombreuses études. Dès 2005, une sous-population associée aux épidémies hospitalières a été identifiée par typage MLST ('*multi-locus sequence typing*') comme 'complexe clonal 17' (CC17) [42]. Depuis, de nombreuses autres études ont confirmé l'organisation des populations de *E. faecium* en clades bien distincts avec certains particulièrement adaptés aux hôpitaux à travers le monde. Ainsi, la population mondiale de *E. faecium* peut être divisée en 2 lignées bien différenciées occupant des niches écologiques qui ne se chevauchent pas, notamment la lignée associée aux hôpitaux (HA) (clade A) qui comprend le CC17 et la lignée associée à la communauté (CA) (clade B) [43]. Au sein du clade A, une subdivision en clade A1 (associé aux infections humaines et aux épidémies hospitalières) et A2 (origine animale) a été proposée mais est débattue à l'heure actuelle [44,45].

Antiseptiques et désinfectants

1. Définitions et principales familles

L'asepsie consiste à maintenir un organisme vivant ou une surface inerte exempt de tout micro-organisme. Ce concept regroupe les notions d'antiseptie, de désinfection et de stérilisation.

L'antiseptie est définie par l'Association Française de Normalisation, AFNOR, comme une "opération au résultat momentané permettant, au niveau des tissus vivants, dans la limite de leur tolérance, d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus [...]." (AFNOR Mars 1981 NF T 72-101). Les antiseptiques sont applicables sur peaux et muqueuses, saines ou lésées. Ils agissent sur les flores commensales de tissus vivants pour éviter leur pénétration dans l'organisme ou leur transmission à des tiers ou dans l'environnement. Ils doivent satisfaire aux critères d'efficacité antimicrobienne tout en respectant l'intégrité des tissus vivants.

La désinfection consiste en la réduction du nombre de micro-organismes dans ou sur une matrice inanimée tels que les matériels médico-chirurgicaux afin d'éviter toute introduction de micro-organismes chez le patient lors de gestes invasifs. Leur action est irréversible en ciblant la structure ou le métabolisme des micro-organismes présents (NF EN 14885 - 2015).

La distinction entre antiseptique et désinfectant est importante, tant par leur usage et l'objectif antimicrobien fixé que par la formulation des produits les contenant. Pour cette raison, les désinfectants ne doivent pas être utilisés comme antiseptiques et inversement. Pour ce travail centré sur les antiseptiques, quatre représentants de grandes familles chimiques et d'usage très courant à l'hôpital comme en communautaire ont été sélectionnés (Tableau 3).

Tableau 3 : Présentation des principales familles et des spectres d'activité d'antiseptiques et de désinfectants actuels, adapté de Hugo *et al.* (58).

Famille chimique	Antiseptique	Spectre d'activité antibactérien			
		Gram +	Gram -	Mycobactéries	Spores
Alcools	Ethanol, isopropanol	++	++	++	0
Ammoniums quaternaires	Chlorure de benzalkonium (BC) , chlorure de cétalpyridinium, cétrimide	+++	+	0	0
Biguanides	Chlorhexidine (CH)	+++	++	0	0
Bisphénols et apparentés	Triclosan (TRI)	+++	+++	0	0
	Hexachlorophène	+++	+	0	0
Dérivés halogénés	Povidone iodée (PVP-I ou Bétadine®)	+++	+++	++	+
	Chloramine, hypochlorite de sodium	+++	+++	++	++

(+++ : activité bactéricide forte, ++ : activité bactéricide moyenne, + : activité bactéricide faible, 0 : activité bactéricide nulle).

2. Mécanismes d'action et usage des molécules étudiées

Les antiseptiques peuvent inhiber la croissance des micro-organismes (bactériostase, virustase, fongistase) ou être responsables de leur lyse (bactéricidie, virucidie, fongicidie) [46]. Certaines molécules présentent les deux types d'action en fonction de la dose appliquée. Le respect du temps de contact entre le produit et la zone concernée est primordial pour l'efficacité de l'antiseptique. De même, la rémanence, c'est-à-dire la persistance sur la zone concernée des effets antimicrobiens de l'antiseptique est un point-clé de son efficacité. L'activité antimicrobienne des antiseptiques peut être altérée par de nombreux facteurs environnementaux tels que le pH, la température, l'humidité, la présence de substances organiques ou des associations incompatibles avec d'autres molécules. De même, les excipients qui varient d'une formulation à l'autre influencent l'efficacité d'un même antiseptique, le plus souvent en recherchant une potentialisation par rapport à la molécule isolée. Actuellement, aucun antiseptique ne couvre à lui seul l'intégralité du spectre antimicrobien requis, c'est-à-dire une activité bactéricide sur les formes végétatives et sur les mycobactéries, combiné à une action sporicide, fongicide et virucide. Pour cette raison, les antiseptiques sont fréquemment utilisés en association afin de couvrir un spectre plus large et de pallier aux altérations de l'efficacité d'une molécule seule par des facteurs interférents (par exemple chlorhexidine et isopropanol, povidone iodée et éthanol).

Les données de la littérature concernant les mécanismes d'action virucide et fongicide des antiseptiques sont restreintes. Concernant leurs propriétés bactéricides, et bien que les mécanismes d'action ne soient pas élucidés pour tous les antiseptiques disponibles sur le marché, trois niveaux sur la bactérie sont identifiés : la paroi, la membrane cytoplasmique et les composants intracellulaires. L'antiseptique peut avoir une cible unique ou agir simultanément sur deux ou trois de ces niveaux. Par ailleurs, indépendamment du site d'action, l'impact de la concentration sur la vitesse de bactéricidie est important à connaître. Ce paramètre nommé η ('concentration exponent' en anglais) décrit la relation entre la dilution et l'activité d'un biocide et est calculé en déterminant le temps nécessaire pour tuer une proportion spécifique de la population bactérienne à une concentration particulière [47]. Il est ainsi considéré comme un marqueur de l'intensité de l'interaction entre l'antiseptique et sa ou ses cible(s). Les alcools et les composés phénoliques comme le triclosan ont une activité antimicrobienne avec une valeur η élevée et sont donc considérablement affectés par les facteurs de dilution. A l'inverse, la chlorhexidine, le chlorure de benzalkonium et la povidone iodée présentent une valeur $\eta < 2$ signant une interaction par liaison chimique ou ionique avec leur(s) cible(s) peu influencée par la dilution, et ce bien que leurs modes d'action soient différents [48].

2.1. La chlorhexidine

2.1.1. Spectre antimicrobien et mécanisme d'action

La chlorhexidine est un antiseptique cationique de la famille des biguanides, hydrosoluble sous forme de sels de gluconate. Le site d'action de la chlorhexidine est la membrane cytoplasmique bactérienne. Chez les bactéries à Gram positif, l'accessibilité de la membrane interne permet une action rapide de l'antiseptique. Chez les bactéries à Gram négatif, la chlorhexidine doit initialement s'adsorber sur la membrane externe par interaction avec les charges négatives du lipopolysaccharide (LPS) et est donc active plus lentement et à de plus fortes concentrations que sur les bactéries à Gram positif. La chlorhexidine est inefficace sur les bactéries sporulées et sur les mycobactéries du fait de l'impossibilité de traverser leurs parois bactériennes de composition particulière pour accéder à la membrane interne. Cependant, la synergie d'action avec l'éthambutol, antituberculeux inhibant la

synthèse de la paroi des mycobactéries permet à la chlorhexidine d'accéder à la membrane interne et d'exercer son activité bactéricide [49]. Cet antiseptique est également fongicide et virucide sur certains virus enveloppés. La chlorhexidine sous forme cationique se fixe aux charges négatives de la membrane bactérienne. A faible concentration (< 0,02%), elle entraîne l'inhibition de certaines enzymes membranaires et la perméabilisation de cette membrane. La fuite des composés intracellulaires de faible poids moléculaire tels que les ions K⁺ et H⁺ perturbe l'équilibre osmotique de la bactérie et provoque une bactériostase. Au-delà de 0,02%, la chlorhexidine entraîne la fuite de composants intracellulaires de plus haut poids moléculaire tels que des nucléotides ou des protéines ainsi que la coagulation du cytoplasme, jusqu'à la lyse bactérienne [50]. Les interférences avec les substances organiques telles que le sérum, le sang total et le pus sont modérées mais entraînent toutefois une perte de l'efficacité antiseptique [50].

2.1.2. Usages de la chlorhexidine

La chlorhexidine est un antiseptique topique disponible en solution aqueuse ou alcoolique ou sous forme de solutions moussantes antiseptiques, à des concentrations bactéricides allant de 0,2% à 4%. Dans les établissements de soins, la chlorhexidine est majoritairement utilisée sous forme de solution alcoolique et de solution moussante. Dans le cas précis de la décolonisation de *S. aureus* (SARM et SASM) avant intervention chirurgicale, la chlorhexidine est utilisée pour la douche et les bains de bouche tout en étant associée à une application nasale de mupirocine pour assurer une décolonisation optimale de la peau, de l'oropharynx et des fosses nasales. Ce protocole est appliqué en systématique ou après dépistage positif à *S. aureus* selon les chirurgies et les pratiques des établissements de soins [12,14].

La rémanence de l'effet antiseptique de la chlorhexidine après séchage a été objectivée par plusieurs études à la fois sur surfaces inertes et sur peau saine [51,52]. Cependant, les auteurs s'accordent sur le manque de méthodologie standardisée, en particulier concernant l'étape critique de la neutralisation de l'antiseptique. Cette étape consiste à inactiver chimiquement l'action de l'antiseptique à l'issue d'un temps de contact prédéfini dans les protocoles d'essais. L'efficacité des solutions neutralisantes varie selon leur composition et leur mode de

fabrication. Ces variations peuvent aboutir à des allongements artéfactuels des temps de contact par rapport aux protocoles annoncés, minimisant donc la fiabilité des résultats [53]. Ces constatations portant sur la chlorhexidine sont extrapolables à tous les antiseptiques, d'autant plus que la composition de la solution neutralisante peut être différente en fonction de l'antiseptique à neutraliser.

2.2. La povidone iodée (PVP-I), ou Bétadine®

2.2.1. Spectre antimicrobien et mécanisme d'action

La povidone ou polyvinylpyrrolidone est un iodophore hydrosoluble dont le polymère solubilisant permet de complexer l'iode actif (I_2) et de prolonger sa diffusion par relargage progressif après application tout en limitant ses effets toxiques. En fonction de la formulation, le relargage du I_2 biodisponible peut aller jusqu'à 1% pour une solution de povidone iodée à 10% [54]. De plus, du fait de l'équilibre entre l'iode lié au polymère (inactif) et l'iode libre (actif), une augmentation paradoxale de l'activité bactéricide est observée lorsque la solution est diluée, avec un maximal d'efficacité à 0,1% [54]. Du fait des propriétés oxydantes du I_2 , cet antiseptique couvre un large spectre antimicrobien en ayant la même efficacité bactéricide sur les bactéries à Gram positif que sur celles à Gram négatif et en étant également actif sur les mycobactéries [55]. Il possède également un large spectre fongicide et virucide.

Le mécanisme d'action n'est pas élucidé bien que les cibles semblent être intracellulaires après le passage rapide du I_2 à travers les membranes bactériennes. Les réactions d'oxydation avec les groupes fonctionnels des protéines, des acides nucléiques et des acides gras membranaires entraînent une désorganisation et un dysfonctionnement global aboutissant à la lyse cellulaire [56]. La povidone iodée est inactivée en présence de matières organiques telles que le sérum, le pus et le sang total. Elle est moins bien tolérée que la chlorhexidine du fait de l'irritation cutanéomuqueuse pouvant être présente après application. D'un point de vue pratique, la coloration brune laissée sur la peau est utile pour s'assurer de l'application correcte du produit sur la zone concernée.

2.2.2. Usages de la povidone iodée

Comme la chlorhexidine, la povidone iodée est majoritairement utilisée sous forme de solutions aqueuse ou alcoolique pour application cutanée et de solutions moussantes antiseptiques en préopératoire en l'absence d'allergie et d'intolérance à l'iode. En alternative à cette dernière, elle peut être utilisée dans le protocole de décontamination des patients porteurs de *S. aureus* avant chirurgie, voire être utilisée par voie intra-nasale [57].

2.3. Le chlorure de benzalkonium

2.3.1. Spectre antimicrobien et mécanisme d'action

Le chlorure de benzalkonium est un sel d'ammonium quaternaire, utilisé comme antiseptique bactéricide, désinfectant et conservateur. La structure chimique consiste en une partie carbonée hydrophobe et une partie cationique hydrophile lui conférant des propriétés tensioactives. Les ammoniums quaternaires sont bactéricides sur les bactéries à Gram positif à de plus faibles concentrations que celles requises pour les bactéries à Gram négatif. Ils ne sont pas efficaces sur les mycobactéries ni sur les spores bactériennes par défaut de perméabilité dû à la paroi. Ils sont plutôt fongistatiques et présentent des propriétés virucides très limitées [58]. Comme la chlorhexidine qui est aussi cationique, les ammoniums quaternaires exercent leur action bactéricide au niveau de la membrane interne par adsorption aux charges négatives et entraînent à terme une fuite des composants intracellulaires et la lyse cellulaire. A fortes doses, ces antiseptiques entraînent la dissolution des membranes bactériennes [55]. Comme tous les ammoniums quaternaires, le chlorure benzalkonium est incompatible avec les savons anioniques et certains détergents non ioniques par formation de micelles [58].

2.3.2. Usages du chlorure de benzalkonium

Les ammoniums quaternaires sont largement utilisés du fait de leur bonne tolérance cutané-muqueuse. Cependant, leur spectre antimicrobien plus restreint que les autres antiseptiques conduit à les utiliser en association à d'autres molécules, telle que la chlorhexidine pour compléter le spectre d'action. Le chlorure de benzalkonium est utilisable en usage local cutané ou par voie nasale, buccale ou vaginale.

2.4. Le triclosan

2.4.1. Spectre antimicrobien et mécanisme d'action

Le triclosan est un dérivé bisphénolique faiblement hydrosoluble. Le site d'action principal présumé est la membrane cytoplasmique, à l'origine de son efficacité préférentielle sur les bactéries à Gram positif. Le spectre antimicrobien inclut les bactéries anaérobies strictes et les mycobactéries [59]. L'effet est bactériostatique à doses faibles et bactéricide à fortes doses par fuite des composants intracellulaires après action sur la membrane interne [46]. Il est également fongicide. Le triclosan est le seul antiseptique parmi les quatre molécules étudiées dont une des cibles a été identifiée. Il s'agit du gène *fabI* qui code pour une enzyme indispensable à la synthèse des acides gras de certaines bactéries dont *E. coli* et *S. aureus* [60,61]. Le gène *inhA*, analogue de *fabI* chez *Mycobacterium smegmatis*, est la cible commune entre l'isoniazide, antituberculeux majeur, et le triclosan [62].

2.4.2. Usages du triclosan

Le triclosan est le produit le moins utilisé en tant qu'antiseptique parmi les quatre molécules sélectionnées pour l'étude. Historiquement, le triclosan était utilisé pour le lavage chirurgical des mains. Son utilisation s'est ensuite largement répandue en tant que conservateur dans les produits cosmétiques et d'hygiène corporelle tels que certains dentifrices, bains de bouche, gels douches, déodorants, crèmes anticernes... Ce produit est actuellement sujet à controverse du fait de ses effets de potentiel perturbateur endocrinien [63]. En Europe, depuis 2013, la concentration maximale tolérée de triclosan dans les produits cosmétiques est fixée à 0,3% et pourrait être revue à la baisse prochainement selon les résultats des travaux coordonnés par la Commission européenne aux sujets de ces perturbateurs endocriniens. En septembre 2016, aux Etats-Unis, la Food Drug Administration (FDA) a ordonné le retrait du commerce des savons contenant du triclosan quelle qu'en soit la concentration.

3. Résistance aux antiseptiques

3.1. Définitions : résistance, sensibilité diminuée, tolérance

Avant de développer ici l'état des connaissances sur la résistance aux antiseptiques, il est important de clarifier cette notion de résistance qui peut être employée pour la description de situations différentes. Une définition précise permet une analyse critique des données scientifiques disponibles en comparant ce qui est comparable. Très généralement, la résistance d'un micro-organisme à un antimicrobien se définit comme sa capacité à survivre aux effets néfastes chimiques ou physiques de cet antimicrobien.

D'un point de vue pratique la résistance est qualifiée selon les cas suivants :

- La souche n'est pas tuée ou inhibée par la concentration d'antimicrobien habituellement efficace sur la majorité des autres souches de la même espèce ;
- La souche n'est pas tuée ou inhibée par la concentration d'antimicrobien obtenue *in vivo*, après administration des doses d'usage.

Cette deuxième définition s'applique aux antibiotiques. En effet, les concentrations d'usage de ces médicaments sont établies sur la base de concentrations critiques sériques obtenues avec les études de pharmacocinétique / pharmacodynamie (PK/PD) qui sont utilisées pour la définition des seuils de sensibilité pour un couple bactérie/antibiotique défini. Ces recommandations sont émises par des groupements d'experts français, le CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) et européen, l'EUCAST ('European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing'). Les souches sont catégorisées sensibles ou résistantes en fonction de la probabilité de succès thérapeutique, respectivement forte ou faible, en cas de traitement par voie systémique avec la posologie recommandée dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP), rédigé par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM).

Les concentrations d'usage des antiseptiques ne reposent pas sur cette méthodologie puisqu'ils ne sont pas utilisés en usage interne mais uniquement en usage externe sur peau et muqueuses. L'efficacité d'un antiseptique est évaluée sur la conformité d'essais normatifs tels que définis par l'AFNOR. Ainsi, un antiseptique ou un désinfectant est considéré efficace et donc commercialisable si à une concentration donnée et pour une

formulation donnée, il entraîne la réduction d'au moins 5 Log₁₀ de la population bactérienne initiale après un temps de contact déterminé sur un support prédéfini. A ces fortes concentrations, les effets bactéricides des antiseptiques résultent d'actions non spécifiques et irréversibles sur de multiples cibles cellulaires. Une souche est définie comme cliniquement résistante lorsqu'elle n'est pas inactivée par cette concentration d'usage de l'antiseptique ou par une concentration de l'antiseptique qui inactive d'autres souches de la même espèce [64]. Comme pour les antibiotiques, il est possible de déterminer *in vitro* les paramètres de concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des antiseptiques mais il ne s'agira alors pas de juger de leur efficacité pour une utilisation pratique. Pour ces tests, les gammes de concentrations sont plus faibles que pour les essais normatifs. Dans ce cadre, une élévation de la CMI est reliée à une sensibilité diminuée de la souche. Lorsque cette CMI est plus élevée que les valeurs typiques de l'espèce, déterminées sur des données épidémiologiques, on parle de tolérance à l'antiseptique.

3.2. Résistance naturelle et résistance acquise

Indépendamment de l'agent antimicrobien, on distingue classiquement les phénomènes de résistance naturelle et de résistance acquise. La résistance naturelle est constante pour une espèce bactérienne et pour un antimicrobien donnés. Elle est conférée par des facteurs intrinsèques à la bactérie tels que la composition de l'enveloppe cellulaire et la présence de certains gènes de résistance au niveau chromosomique [65]. La résistance acquise est le résultat d'une mutation ou de l'acquisition de nouveaux déterminants génétiques après transfert horizontal de gènes [65]. S'agissant des antiseptiques, l'acquisition de résistance par mutation ou par court-circuit métabolique a été décrite mais ces phénomènes restent à la marge par rapport à des mécanismes de protection plus globaux. Pour l'heure, ces deux mécanismes de résistance n'ont été décrits que pour le triclosan, respectivement chez *M. smegmatis* et chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [62,66]. En revanche, des résistances résultant d'une protection plus large contre les antiseptiques ont été fréquemment rapportées. Ainsi, des modifications de la perméabilité membranaire et/ou une augmentation de l'efflux actif et/ou la dégradation enzymatique de l'antiseptique peuvent conduire à une sensibilité diminuée voire une résistance aux antiseptiques.

Les changements de perméabilité ne concernent pas les bactéries à Gram positif et ne seront donc pas décrits. Chez ces dernières, l'efflux actif est un des mécanismes les plus fréquents, principalement chez *S. aureus* [67–69]. Physiologiquement, l'efflux actif permet à la bactérie d'évacuer dans l'environnement extra-cellulaire des composants toxiques dont des agents antimicrobiens. Il existe 5 grandes classes de pompes d'efflux, elles-mêmes divisées en 2 grands types en fonction de la nature de l'énergie utilisée pour leur fonctionnement. Les pompes fonctionnant à l'aide de gradients d'ions H^+ (force protomotrice) ou Na^+ sont les pompes MFS (Major Facilitator Superfamily), RND (Resistance-Nodulation cell Division), MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) et DMT (Drug/Metabolite transporter) dont font partie les pompes SMR (Small Multidrug Resistance). Le fonctionnement des pompes à force protomotrice est basé sur le transport simultané de cations et du composé à effluer, dans la même direction (symport) ou en sens opposé (antiport) [70]. Les autres pompes, nommées transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette), utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP (Figure 7) [71].

Actuellement, environ 340 systèmes d'efflux sont répertoriés chez *S. aureus* et 400 chez *E. faecalis* et chez *E. faecium*, principalement représentés par les familles MFS et ABC (www.membranetransport.org). Concernant l'efflux actif des antiseptiques, ce sont majoritairement des pompes MFS et SMR qui ont été décrites et dont substrats les plus fréquents sont la chlorhexidine et le chlorure benzalkonium (Tableau 4). Ces systèmes d'efflux ne sont pas spécifiques et sont donc responsables de l'exportation d'autres composés parmi lesquels des antibiotiques. Pour l'heure, ni le triclosan, ni la PVP-iodée n'ont été identifiés comme substrat de pompes d'efflux chez des bactéries à Gram positif.

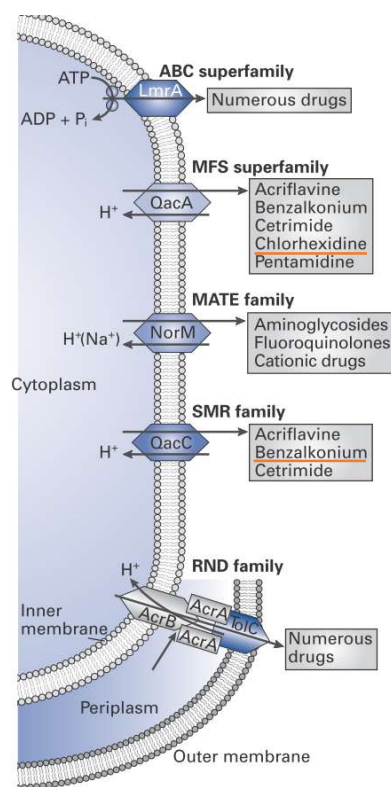


Figure 7 : Représentation schématique des 5 grandes classes de pompes d'efflux et leurs principaux substrats, issu de Russel *et al.* (71).

Les pompes RND ne sont présentes que chez les bactéries à Gram négatif. Les pompes MFS et SMR sont les plus couramment décrites pour l'efflux des antiseptiques chez les bactéries à Gram positif.

Tableau 4 : Systèmes d'efflux impliqués dans la résistance aux antiseptiques répertoriés chez *S. aureus* et *E. faecium*.

Famille	Nom	Support génétique	Substrats	Références
<i>S. aureus</i>				
MFS	NorA	Chromosome	Fluoroquinolones hydrophiles (norfloxacine, ciprofloxacine) Chlorure de benzalkonium	[72]
MFS	MdeA	Chromosome	Chlorure de benzalkonium Mupirocine	[73]
MATE	MepA	Chromosome	Tigécycline Chlorure de benzalkonium Chlorhexidine	[74]
Non classé	SepA	Chromosome	Chlorure de benzalkonium	[75]
MFS	QacA/B	Plasmide	Chlorure de benzalkonium Chlorhexidine	[76]
SMR	QacG/H/J	Plasmide	Chlorure de benzalkonium	[77–79]
SMR	Smr (ou QacC/D ou Ebr)	Plasmide	Chlorure de benzalkonium Chlorhexidine	[80]
<i>E. faecium</i>				
ABC	EfrA/B	-	Chlorure de benzalkonium Chlorhexidine	[81]

3.3. Conséquences en pratique clinique ?

Les conséquences de la résistance aux antiseptiques sont à considérer sur deux aspects distincts. En premier lieu, la perte de la capacité de ces molécules à obtenir une antiseptie rigoureuse et conforme représente un risque en pratique clinique. Bien qu'aucun cas d'échec thérapeutique imputable à une résistance intrinsèque ou acquise n'ait été clairement décrit, il est indéniable qu'un défaut d'antiseptie en préopératoire peut s'accompagner d'infections de sites opératoires. Pour illustration, la littérature rapporte des cas de contaminations de produits antiseptiques liées à des manquements aux règles d'hygiène qui ont conduit à des épidémies de péritonites secondaires à *P. aeruginosa* [82] et d'arthrites septiques à *Serratia marcescens* [83]. Le second point de questionnement concerne l'émergence de souches résistantes ou de sensibilité diminuée qui seraient conjointement résistantes à des antibiotiques. En effet, les antibiotiques et les antiseptiques partageant les mêmes principes d'action antibactérienne, ils pourraient avoir des cibles communes. Le seul exemple connu actuellement est celui de l'enzyme InhA de *M. smegmatis* qui est une cible commune du triclosan et de l'isoniazide avec toutefois un site de fixation à l'enzyme distinct entre les deux molécules [62]. Ainsi, l'abondance de la consommation des antiseptiques et des désinfectants, en contexte hospitalier, industriel et ménager et leur présence dans l'environnement, même à de faibles concentrations dites subinhibitrices (CSI), pourrait constituer une pression de sélection omniprésente. Ces faibles concentrations peuvent être le résultat d'usages inadaptés (dilution inappropriée, interférences avec des substances chimiques ou biologiques incompatibles), de la décroissance normale par dégradation du principe actif, ou encore par le relargage d'effluents contenant ces produits dans l'environnement [71]. Cette situation serait propice à la sélection de résistances croisées aux antibiotiques, notamment par mutation ou par hyper-expression de systèmes d'efflux communs [84]. De plus, des co-résistances antibiotiques-antiseptiques peuvent exister du fait de la présence des gènes localisés sur un même support génétique. Ces gènes sont portés par des éléments génétiques mobiles, plasmides ou transposons, capables de transferts horizontaux de gènes entre bactéries. En 2002, une étude norvégienne portant sur 238 souches cliniques de *S. aureus* isolées d'infections en onco-pédiatrie retrouvait 50% de souches de sensibilité diminuées au chlorure de benzalkonium (CMI > 3 mg/L). Pour 78 d'entre elles, les plasmides portant les gènes

d'efflux *qac* comprenaient aussi un gène codant pour une β -lactamase (*blaZ*) et/ou une pompe d'efflux de la tétracycline (*tet(K)*) [85]. Cette fréquence de distribution n'est pas retrouvée pour les entérocoques pour le moment. Pour preuve, la première description de souches porteuses des gènes *qacA/B* date de 2012 pour *E. faecalis* et de 2016 pour *E. faecium* [86,87] et aucune prévalence n'a pas été rapportée depuis.

3.4. Comment la détecter ?

Comme vu précédemment, la détection de la résistance à un antibiotique repose généralement sur une forte corrélation entre les résultats des essais *in vitro* (sensibilité ou résistance) et les issues thérapeutiques en pratique clinique (succès ou échec). Pour les antiseptiques, la corrélation n'est pas si évidente. En effet, la CMI ne reflète pas nécessairement l'efficacité bactéricide, notamment en raison des actions pléiotropes de ces molécules sur la cellule bactérienne [50]. Par exemple, les CMI de la chlorhexidine et du cétrimide sont quasiment identiques pour *S. aureus* et les mycobactéries alors que l'efficacité bactéricide de ces molécules est très supérieure sur *S. aureus* [88]. De même, l'usage externe des antiseptiques et leurs index thérapeutiques, beaucoup plus larges que ceux des antibiotiques, permettent l'élaboration de formulations galéniques à des concentrations très supérieures aux CMI pour éradiquer les micro-organismes sur la zone concernée sans regard pour la relation dose/efficacité. Les méthodes d'étude de sensibilité développées pour les antibiotiques sont donc d'une interprétation délicate s'agissant des antiseptiques. Elles ne semblent pas constituer à elles seules un argument suffisant pour qualifier une résistance de réalité clinique et justifier des changements de recommandations dans l'usage des molécules. Cependant, les essais *in vitro* de déterminations de CMI et CMB des antiseptiques peuvent trouver leur place pour la mise en évidence d'une interaction avec une cible et en tant que marqueur d'une tendance vers la sensibilité diminuée et la résistance. Les expériences de vitesse de bactéricidie, en étudiant un processus dynamique peuvent également permettre de distinguer l'émergence d'une sous-population présentant une sensibilité diminuée, une tolérance voire une résistance. Actuellement, ces études *in vitro* ne sont pas effectuées en routine dans les laboratoires de biologie médicale.

Les ARN régulateurs

L'adaptation des bactéries aux variations de conditions environnementales mettent en jeu de nombreux mécanismes de régulation qui s'exercent à chaque étape depuis la transcription d'un gène jusqu'à l'activité de la protéine produite. Ainsi, cette régulation peut survenir dès l'initiation de la transcription ou lors de l'élongation transcriptionnelle, on parle alors de régulations transcriptionnelles car elles influent directement sur la production du transcrit. Une fois produit, ce transcrit peut faire l'objet de régulations dites post-transcriptionnelles ayant un impact sur sa stabilité ou traductionnelles/post-traductionnelles ayant un impact sur la traduction en protéine et sur son fonctionnement. Les ARN régulateurs sont de plus en plus décrits comme acteurs de ces régulations, chez les eucaryotes comme chez les procaryotes [89]. Les ARN régulateurs bactériens appelés sARN dans la suite de ce manuscrit, jouent un rôle majeur dans l'adaptation rapide aux changements dynamiques de l'environnement [90]. Après une définition générale succincte, les sARN de *S. aureus* et *E. faecium* au cœur de ce travail de thèse seront détaillés.

1. Définitions et modes d'action

Les sARN sont classiquement définis comme des ARN ayant une taille comprise entre 50 et 500 nucléotides, généralement non codants, qui interagissent avec d'autres ARN (ARN messenger, ARNm) ou des protéines, dans des conditions environnementales spécifiques. Comme évoqués précédemment, les sARN peuvent exercer leur régulation à tous les niveaux depuis la transcription jusqu'au fonctionnement d'une protéine. La majorité des sARN décrits présentent une interaction avec une cible ARNm qu'ils régulent à un niveau post-transcriptionnel [90]. Les autres niveaux de régulations ne seront pas détaillés ici. S'agissant des interactions sARN – ARNm, on distingue de façon simplifiée les sARN agissant en '*cis*' et en '*trans*'. Les régulateurs ayant une action dite en *cis* sont situés sur le même locus et sur le brin opposé à leur cible avec laquelle ils interagissent fortement par complémentarité parfaite de bases. Les sARN ayant une action en *trans* sont quant à eux situés sur un locus à distance de leurs cibles. L'interaction est basée sur une complémentarité imparfaite des séquences ce qui signifie

qu'elle sera plus faible mais aussi qu'elle peut concerner plusieurs cibles [91]. Les principales régulations issues de ces interactions ARN – ARN sont présentées dans la Figure 8 [92].

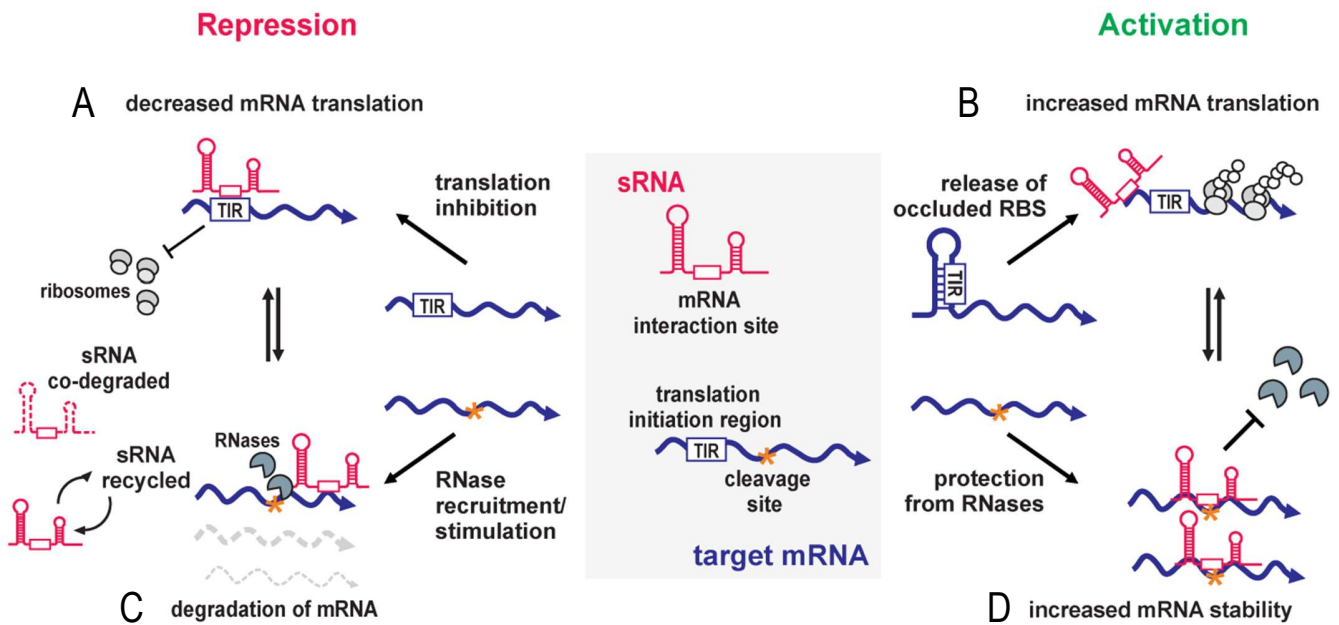


Figure 8 : Principales régulations post-transcriptionnelles issues de l'interaction sARN-ARNm, issu de Svensson et Sharma (92).

La régulation du processus de traduction qui résulte de la fixation du sARN est figurée (A) dans le sens de la répression avec séquestration du site d'initiation de la traduction (TIR), (B) dans le sens d'une induction avec changement de conformation de l'ARNm et libération du site d'initiation de la traduction (TIR). L'effet de l'interaction sARN-ARNm sur la stabilité de ce dernier est figuré (C) dans le cas du recrutement de RNase qui augmente la dégradation, (D) dans le masquage du site de clivage qui augmente la durée de vie l'ARNm.

Le sens de la régulation peut être répressif ou activateur et les conséquences biologiques variables selon les fonctions physiologiques des cibles concernées. Pour ces deux types de variations, les régulations post-transcriptionnelles impactent soit le phénomène de traduction, soit la stabilité de l'ARNm. Pour le phénomène de traduction, la conséquence de l'interaction sARN – ARNm peut être la séquestration ou la libération du site d'initiation de la traduction (TIR, 'translation initiation region') ayant pour effet respectif une inhibition et une induction de la traduction (Figure 8 A et B). Pour l'effet sur la stabilité de l'ARNm, elle sera diminuée ou augmentée selon que l'interaction avec le sARN résulte en un recrutement de RNase ou en un masquage du site de clivage enzymatique présent au sein de l'ARNm (Figure 8 C et D).

2. sARN et *S. aureus*

Depuis quelques années, les données de sARN de *S. aureus* ont été multipliées par autant de techniques de détection que de souches et de conditions de culture. En 2015, un travail de compilation de données comparables avec validation expérimentale en RNA-seq a proposé une liste de 159 sARN [93]. En 2018, une définition de sARN 'bona fide' a été proposée sur des critères précis et réduisait la liste de sARN à 50 dans la souche HG003 [94]. Pour être retenu en tant que tel, un sARN devait avoir ses propres promoteur et terminateur transcriptionnels et sa séquence ne devait pas chevaucher une séquence codante sur le brin opposé. Dans ce manuscrit, le choix a été fait de ne détailler que les sARN de *S. aureus* étudiés au cours de cette thèse. La terminologie de certains d'entre eux en 'Spr' ('small pathogenicity island RNAs') tient au fait qu'ils ont été localisés au sein d'îlots de pathogénicité génomiques contenant des gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques [95].

2.1. ARNIII

À ce jour, l'ARNIII est le sARN le plus étudié et le plus caractérisé. Il s'agit d'un sARN long de 514 nucléotides qui possède également une séquence codante correspondant à une δ -hémolysine [96]. Il est le principal effecteur du système *agr* de quorum-sensing qui régule directement et indirectement l'expression de nombreux gènes de virulence en fonction de la densité bactérienne [97,98]. L'effet de l'ARNIII est généralement associé à la transition colonisation-infection via l'activation de ce système *agr* et à l'augmentation de l'expression des facteurs de virulence [97]. A ce jour, 8 cibles directes ARNm ont été identifiées dont 6 ARNm codant pour des facteurs de virulence et 2 pour des régulateurs protéiques globaux [90]. A noter, une interaction directe sARN-sARN a été récemment décrite entre RNAIII et SprY, ce dernier agissant comme une éponge à ARNIII pour diminuer son activité pro-virulente [99].

2.2. SprD

Ce sARN a été impliqué dans la virulence de *S. aureus* [95]. La protéine Sbi ayant un rôle dans l'adhésion et l'évasion immunitaire est la seule cible de SprD connue à ce jour [100]. La liaison directe de SprD sur l'ARNm de *sbi* se fait au niveau du site de fixation du ribosome (RBS, 'Ribosome Binding Site') et entraîne une inhibition de

sa traduction. La preuve de l'implication de SprD dans la virulence a été obtenue *in vivo* dans un modèle murin de sepsis avec une mortalité atténuée en cas d'infection par une souche mutante $\Delta sprD$. Pour expliquer une telle variation de phénotype, il est très probable que SprD régule d'autres cibles critiques pour la pathogénie de *S. aureus*, cibles non identifiées actuellement.

2.3. SprC

Contrairement à SprD, SprC a été initialement caractérisé comme un sARN anti-virulent en modèle murin de sepsis [101]. Dans ce travail, l'infection par souche $\Delta sprC$ entraînait une augmentation de la virulence et de la dissémination bactérienne. L'ARNm Atl produisant une autolysine majeure a été identifié comme une cible directe dont la traduction était inhibée après liaison à SprC, ce qui semblait avoir un impact sur l'internalisation de *S. aureus* par les macrophages. A noter, l'expression de SprC a été montrée comme elle-même régulée négativement par le facteur protéique de transcription SarA, laissant entrevoir le niveau de complexité de ces réseaux de régulation [102]. Paradoxalement, SprC a montré un profil plutôt pro-virulent dans un modèle d'infection chez *Galleria mellonella* [103].

2.4. SprB

Aucune cible n'est à ce jour connue pour SprB et à ce titre, il est le sARN de type 'Spr' le moins bien caractérisé. Il a été proposé comme un marqueur de clonalité dans une étude comprenant 83 isolats cliniques de *S. aureus* [104]. Il figure parmi les sARN sélectionnés sur les critères *bona fide* proposé en 2018, au contraire de SprC et SprF1 [94].

2.5. SprX

SprX a été initialement identifié comme un sARN impliqué dans la réponse au stress antibiotique et était notamment relié à une diminution de la résistance aux glycopeptides [105]. Une des cibles directes est l'ARNm SpoVG dont la traduction est inhibée par la fixation de SprX sur son RBS. Une deuxième cible directe de SprX est l'ARNm Ecb dont la traduction est aussi inhibée par fixation de SprX au RBS [106]. La protéine Ecb appartient aux facteurs de virulence sécrétés de type SERAM et est impliquée dans les phénomènes d'adhésion et

d'échappement au système immunitaire [107]. Le sARN SprX pourrait donc être impliqué dans un réseau de régulation influençant la résistance aux antibiotiques et la virulence de *S. aureus*.

2.6. SprF1

Le sARN SprF1 est le composant antitoxine du système toxine-antitoxine de type I SprF1/SprG1 [108]. En plus de contrôler l'expression de la toxine SprG1, ce dernier est également responsable d'une atténuation globale de la synthèse protéique par fixation aux ribosomes et perturbation de l'initiation de la traduction. Ce mécanisme original a été mis en évidence comme impliqué dans la survenue de cellules persistantes appelée 'persisters' lors d'essais *in vitro* [109]. Pour ce travail de thèse, le mutant délété de tout le système a été étudié en raison de la toxicité de SprG1 si elle n'est plus sous le contrôle de SprF1.

3. sARN et *E. faecium*

En stricte opposition aux nombreuses connaissances sur les sARN de *S. aureus*, celles sur les sARN de *E. faecium* sont très restreintes. En 2017, les premiers sARN de l'espèce *E. faecium* ont été mis en évidence [110]. Dans ce travail réalisant une analyse transcriptomique comparative en absence ou présence de CSI de daptomycine, 61 sARN putatifs ont été identifiés. Parmi eux, 10 candidats ont ensuite été validés par Northern-blot (Figure 9). L'analyse par RT-qPCR a montré que l'expression de 6 d'entre eux était significativement modifiée en présence de CSI de daptomycine. De plus, 8 de ces sARN validés étaient retrouvés dans toutes les souches de clade A comprises dans l'étude et absente du clade B, laissant suggérer un potentiel rôle dans la pathogénicité d'*E. faecium* et dans la réponse au stress antibiotique. Ces données ont permis d'effectuer une première caractérisation de ces sARN avec leurs tailles, la présence ou non de formes alternatives et leurs profils d'expression en fonction de la phase de croissance avec et sans stress antibiotique (Figure 9).

Plus récemment, une approche globale de RNA-seq en conditions physiologiques non reliées à un stress couplée à la prédiction des sites d'initiation de transcription a porté la liste à 165 sARN prédits chez *E. faecium* [111]. Dans l'ensemble de ces deux études, 17,5% des prédictions (29/165) ont été confirmées expérimentalement par Northern-Blot mais aucune donnée n'a été fournie sur leurs fonctions biologiques. Cet état de connaissances

restreintes sur les sARN de *E. faecium* a été le contexte de 2 autres thèses de Doctorat soutenues par les Dr Le Neindre et Reissier en 2021 [112, 113]. Dans ces travaux, les sARN d'*E. faecium* ont été renommés « Ern » pour *Enterococcus ribonucleic acid*, nomenclature appliquée dans ce travail de thèse.

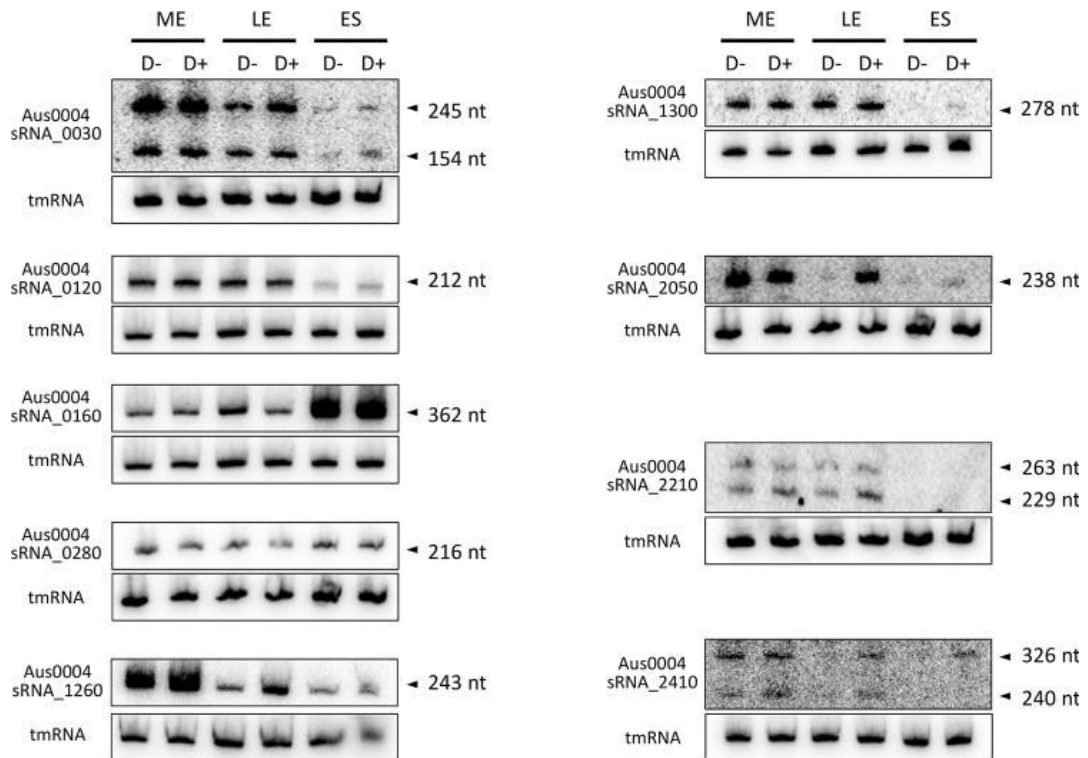


Figure 9 : Northern-Blot validant 10 sARN candidats exprimés par *E. faecium*, issu de Sinel *et al.* (110).

Les ARN totaux ont été extraits à trois phases de croissance : milieu de phase exponentielle (ME), fin de phase exponentielle (LE) et début de phase stationnaire (ES) et en présence (D+) ou non (D-) de CSI de daptomycine.

Synthèse comparative

Les principales caractéristiques communes et distinctes des deux espèces étudiées sont résumées dans le Tableau 5. De manière générale, quel que soit la thématique par laquelle l'espèce bactérienne est abordée, *S. aureus* a fait l'objet de beaucoup plus de travaux de recherche à la fois cliniques et fondamentaux pour en déchiffrer les mécanismes de pathogénicité. Bien que l'incidence des infections à *E. faecium* soit en augmentation et que les problèmes de résistance aux antibiotiques soient en plus en plus décrits, les travaux de recherche restent moins nombreux (Figure 10).

Tableau 5 : Synthèse des principales caractéristiques des deux espèces bactériennes étudiées

	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecium</i>
Habitat chez l'homme	Peau, nez	Tube digestif
Infections les plus courantes	Infections de la peau et des tissus mous, infections ostéo-articulaires, bactériémies, endocardites, infections associées aux soins	Infections urinaires, intra-abdominales, bactériémies, endocardites, infections associées aux soins
Distribution	Communautaire Hospitalière – Associée aux soins	Hospitalière – Associée aux soins
Voie de contamination	Endogène Manuportage Matériel et environnement contaminé	Endogène Manuportage Matériel et environnement contaminé
Persistance dans l'environnement	+++	+++
Virulence	+++	+
Résistance	+	+++
Antibiotique critique majeur	Méticilline	Vancomycine
Utilisation ciblée des antiseptiques	Désinfection patients porteurs mupirocine / chlorhexidine	Non applicable
sARN		
Année de découverte	1989 [114]	2017 [110]
Nombre répertorié	≈ 50 [94]	29 [110, 111]
Fonctions identifiées	Certaines	Aucune

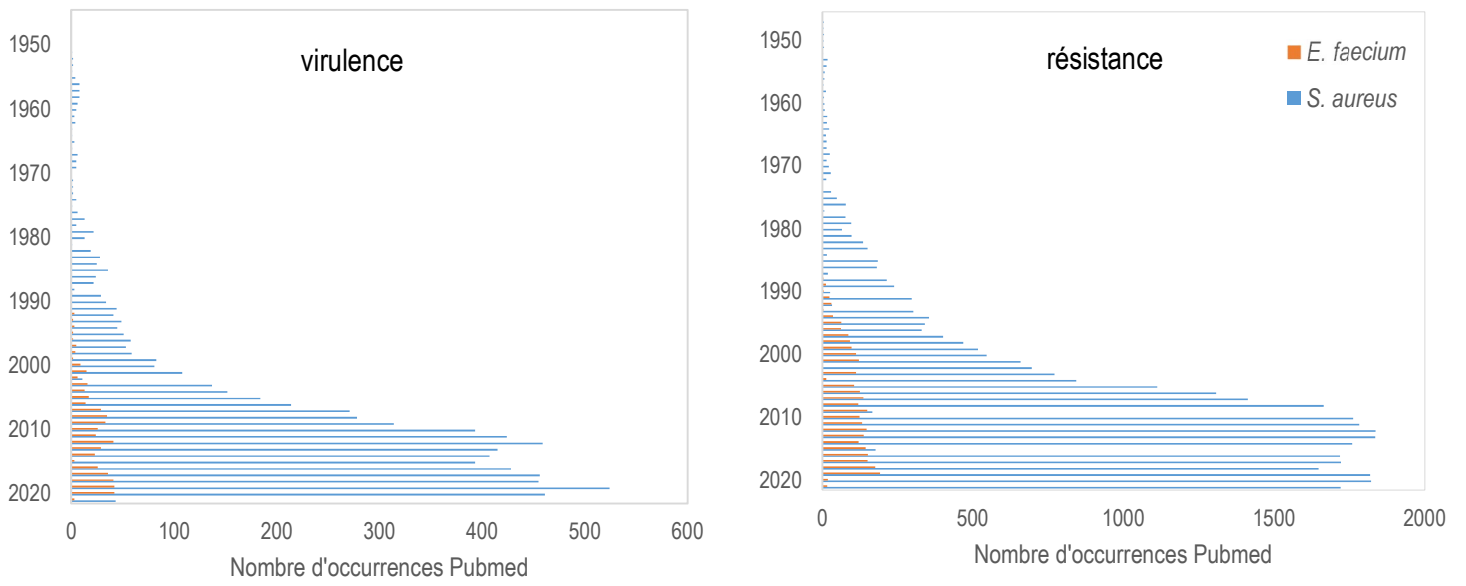


Figure 10 : Fréquences de publications scientifiques sur les termes Virulence (à gauche) et Résistance (à droite) pour les deux bactéries étudiées avec utilisation du filtre «Human species ».

PROJET DE RECHERCHE

Le projet de recherche s'est articulé autour de trois axes avec pour objectif de faire le lien entre les pathogènes nosocomiaux à Gram positif *S. aureus* et *E. faecium*, les antiseptiques d'usage courant et les réseaux de régulation médiés par les sARN. Pour chaque « pas » effectué au cours de travail, il a fallu jongler avec l'état des connaissances le plus souvent très avancé chez *S. aureus* en regard de la pauvreté des informations disponibles chez *E. faecium*. Pour ces raisons, les axes n°1 et 2 intègrent les deux bactéries et leurs sARN alors que l'axe n°3 s'est concentré à faire évoluer les connaissances chez *E. faecium*. Les résultats ont fait l'objet de deux publications scientifiques présentées au sein du corps du texte, une acceptée en 2021 et l'autre soumise en 2022 ainsi que de deux communications affichées, au congrès international de l'ECCMID (European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases) en 2019 et au congrès national de la SFM (Société Française de Microbiologie) en 2022 (Annexe 2 et Annexe 7).

AXE N°1 : ETUDE DE L'ACTIVITE DES ANTISEPTIQUES SUR *S. aureus* ET *E. faecium*

Le prérequis pour assurer une méthodologie reproductible du stress antiseptique a été la mise au point des protocoles d'étude pour chacun des antiseptiques étudiés. Cet axe a donc été l'objet d'une analyse bibliographique approfondie des antiseptiques comme détaillé ci-avant puis du développement de protocoles pour l'étude en conditions réelles d'utilisation (*i.e.* à forte concentration) et en simulation de concentrations plus faibles (CMI, CMB) voire résiduelles (CSI).

Matériels et méthodes

1. Souches bactériennes

La souche Aus0004 a été isolée pour la première fois en 1998 à Melbourne, Australie à partir d'hémocultures. Elle appartient au CC17 et son génome est entièrement séquencé et annoté (GenBank accession number : CP003351.1) [115]. Sa taille est de 3,02 Mb et comprend un chromosome circulaire de 2,90 Mb et 3 plasmides. Son génome accessoire représente 38% du génome entier et comprend, en plus des 3 plasmides, 3 prophages et 2 îlots génomiques. Le gène *vanB* qui confère la résistance à la vancomycine est porté par le transposon Tn1549 présent en un seul exemplaire dans le chromosome. Les constructions des souches délétées et des souches de complémentation de sARN d'intérêt ont été intégrées ultérieurement dans ces essais. Elles ont été obtenues par le Dr. Killian Le Neindre ayant également effectué sa thèse d'Université sur les sARN de *E. faecium* au sein du laboratoire [112]. Pour des raisons de fluidité de lecture, tous les résultats seront présentés ensemble même s'ils ont été obtenus quelques fois à des temps différents. Le cas échéant, les résultats ont été comparés entre les souches native et délétée d'une part, cultivées sans pression de sélection antibiotique et entre les deux souches complémentées avec le vecteur pAT29 avec et sans surexpression de Ern0160 d'autre part, cultivées en milieu supplémenté de spectinomycine à 300 mg/L. Pour *S. aureus*, du fait de l'expertise de l'unité de recherche U1230 dans le domaine des sARN de *S. aureus*, des souches délétées de sARN jugés potentiellement pertinents ont été incluses d'emblée dans les essais. Tous les mutants étaient disponibles dans le fond génétique de la souche HG003 à l'exception du sARN SprX, délétion faite dans la souche HG001. Pour cette raison, les essais ont été réalisés sur les deux souches natives. Les souches HG003 et HG001 sont issues de la souche parentale

NTCT8325 et ne diffèrent entre elles que par le gène *tcaR*, activateur de transcription de la protéine A (MSCRAMM), fonctionnel dans HG003 et tronqué dans HG001 [116]. *S. aureus* HG003 est la souche de référence pour l'étude de la régulation transcriptionnelle des gènes [117]. Les principales caractéristiques des souches et les tests effectués sont colligés dans le Tableau 6. Les inocula bactériens étaient préparés à la DO₆₀₀ souhaitée à partir de précultures du jour précédent les essais. Le cas échéant, les dénombrements bactériens étaient effectués après dilutions successives et ensemencement sur géloses Trypticase-Soja (TS). L'intégralité des essais a été réalisée en triplicats biologiques.

2. Prérequis des tests sur antiseptiques

Comme évoqués précédemment, les protocoles d'étude des antiseptiques sont nombreux, peu standardisés et donc peu reproductibles et comparables. Afin de nous assurer que le stress antiseptique que nous souhaitons appliquer aux souches en vue de l'étude de l'expression des sARN soit réaliste, cohérent et reproductible, une « familiarisation » avec ces molécules et leur comportement physico-chimique a été nécessaire. Les principales caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le Tableau 7.

Tableau 6 : Récapitulatif des souches et des essais réalisés pour la caractérisation globale de l'action des antiseptiques sélectionnés.

Souches	Caractéristiques	Fonctions sARN (référence)	Tests effectués			
			Essai normatif	CMI	CMB	CSI
S. aureus N = 8						
HG003	Souches de référence pour l'étude de la régulation transcriptionnelle des gènes [117]		x	x	x	x
HG001			x	x	x	x
HG003 Δ sprC	HG003 délétée du sARN SprC	Anti-virulent, inhibition de l'autolysine, favorisation de la colonisation [101]	nd	x	x	x
HG003 Δ sprD	HG003 délétée du sARN SprD	Pro-virulent, contribution à l'évasion du système immunitaire de l'hôte [95]	x	x	x	x
HG003 Δ sprG1/sprF1	HG003 délétée des sARN SprG1/SprF1	Système toxine-antitoxine, implication dans la persistance [109]	x	x	x	x
HG003 Δ ARNIII	HG003 délétée du sARN ARNIII	Quorum sensing, transition colonisation-infection [97]	x	x	x	x
HG003 Δ sprB	HG003 délétée du sARN SprB	Clade spécifique, fonction inconnue [104]	x	x	x	x
HG001 Δ sprX	HG001 délétée du sARN SprX	Rôle dans la résistance aux glycopeptides [105]	x	x	x	x
E. faecium N = 4						
Aus0004	Souches clinique issue de bactériémie, <i>vanB</i> , CC17 [115]		x	x	x	x
Aus0004 Δ ern0160	Aus0004 délétée du sARN Ern0160	Inconnu, identifié en 2017 [110]	nd	x	nd	x
Aus0004 Δ ern0160_pAT29	Souche Δ ern0160 trans-complémentée avec le plasmide pAT29 vide [118]		nd	x	nd	x
Aus0004 Δ ern0160_pAT29 Ω ern0160	Souche Δ ern0160 trans-complémentée avec le plasmide pAT29 surexprimant <i>ern0160</i> [118]		nd	x	nd	x

CMI : concentration minimale inhibitrice ; CMB : concentration minimale bactéricide ; CSI : concentration subinhibitrice ; nd : non déterminé

Tableau 7 : Principales caractéristiques physico-chimiques des antiseptiques sélectionnés.

Nom	Famille	Formulation	Solvant	Conservation	Hydrosolubilité limite
Chlorhexidine digluconate	Biguanide	Solution à 20%	Eau stérile	4°C, à l'abri de la lumière	-
Chlorure de benzalkonium	Ammonium quaternaire	Semi-solide	Eau stérile	Température ambiante	100 g/L
Povidone iodée	Dérivé iodé	Poudre	Eau stérile	Température ambiante	100 g/L
Triclosan	Bisphénol	Poudre	Ethanol 60%	Température ambiante	0,012 g/L

2.1. Solubilité

La solubilisation des composés a pu être effectuée dans de l'eau ultrapure pour tous les composés sauf le triclosan. La littérature reporte pour ce dernier l'usage de nombreux solvants organiques [119,120]. Dans ce travail, nous avons choisi de comparer l'éthanol et le DMSO en raison de leur usage publié rendant la comparaison possible avec d'autres travaux scientifiques. Le DMSO 40% n'a pas été efficace pour solubiliser totalement la poudre de triclosan aux concentrations souhaitées, de même que l'éthanol à moins de 60%. Pour cette raison, le solvant retenu pour le triclosan a été l'éthanol 60% (EtOH 60%). L'innocuité du solvant a été vérifiée par l'étude de la croissance de *S. aureus* HG003 et *E. faecium* Aus0004 qui ne retrouvait pas de différences par rapport à la croissance dans du milieu sans solvant.

L'incorporation des solutions stocks d'antiseptiques aux milieux de cultures Mueller-Hinton ajusté en cations (MH2) et *Brain-Heart Infusion* (BHI) n'a pas formé de précipités.

2.2. Stabilité

Devant l'absence d'information disponible au laboratoire et dans la littérature sur les possibilités de conservation des antiseptiques en milieu de culture, leur stabilité et donc le maintien de leur efficacité a été testée selon plusieurs modalités : conservation à 4 °C pendant 24h, 48h, 7 jours et à -20°C pendant 7 jours. Les tests de CMI et CMB étaient réalisés en parallèle avec des solutions d'antiseptiques préparées extemporanément et les résultats ont été comparés. La stabilité de l'activité bactéricide a été confirmée pour la chlorhexidine digluconate, la povidone iodée et le chlorure de benzalkonium pour toutes les conditions de

conservation testées. En revanche, l'activité du triclosan était amoindrie au-delà de 48h à 4°C. De plus, sa conservation à -20°C n'a été possible ni pour la solution stock dans le solvant EtOH 60%, ni dans le milieu de culture en raison de la formation de précipités à la décongélation et ne disparaissant pas par chauffage. Pour ces raisons, le triclosan a été conservé en solution éthanolique pure à -20°C avec ajout extemporané de l'eau ou des milieux de culture.

3. Vérification de l'efficacité aux concentrations d'usage

L'AFNOR représente la France auprès de l'Organisation internationale de normalisation et du Comité européen de normalisation. Les formulations commerciales d'antiseptiques et de désinfectants sont conformes s'ils répondent notamment aux critères de la norme NF EN 13727 relative à l'essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide en médecine. Dans ce type d'essai protocolisé, les composés sont très concentrés. La réalisation de ces essais avait pour but de compléter les données des antiseptiques sur les souches choisies, ainsi que de vérifier l'efficacité des composés en solutions simples sans excipients.

3.1. Principe

Ce protocole normatif NF EN 13727 permet de déterminer l'activité bactéricide d'un antiseptique par la méthode de dilution/neutralisation. Le principe est le suivant : une suspension bactérienne est mise en contact pendant un temps défini et à une température donnée avec une solution de substance interférente et avec un antiseptique. La substance interférente est classiquement composée de protéines pour mimer d'éventuels résidus organiques. A la fin du temps de contact prédéfini, l'ajout d'une substance neutralisante permet d'inhiber les propriétés antimicrobiennes de l'antiseptique testé. Le dénombrement bactérien dans le mélange neutralisé est comparé à celui de l'inoculum initial. La norme NF EN 13727 définit un produit comme étant bactéricide s'il laisse moins de 0,001% de bactéries survivantes, soit une réduction de 5 Log₁₀ du nombre de bactéries viables de l'inoculum initial.

3.2. Préparation des inocula

Les suspensions bactériennes ont été préparées dans du bouillon MH2 et ajustées à une $DO_{600} = 0,3$ soit environ 3×10^8 UFC/mL.

3.3. Préparations des solutions

Les antiseptiques ont été testés à une concentration initiale à 1,25 fois la concentration normale d'usage pour tenir compte de la dilution par la suspension bactérienne et le neutralisant (Tableau 8). Le milieu de culture utilisé était le MH2, la substance interférente du lait UHT écrémé dilué au 1/10^{ème} et stérilisé par filtration. La substance neutralisante commerciale (nommée bouillon de Dey Engley, notamment utilisé dans l'industrie cosmétique) étant onéreuse, une fabrication de solution universelle maison a été préférée (Tableau 9). Cette solution était préparée le jour même de l'essai de dilution/neutralisation et conservée +4°C avant usage pour éviter toute contamination de la préparation.

Tableau 8 : Concentrations d'usage et de l'essai de dilution – neutralisation pour les solutions antiseptiques.

Nom	Concentration d'usage	Concentration pour l'essai (x 1,25)
Chlorhexidine digluconate	0,5%	6,25 g/L
Chlorure de benzalkonium	0,5%	6,25 g/L
Povidone iodée	10%	125 g/L
Triclosan	0,3%	3,75 g/L

Tableau 9 : Composition de la solution neutralisante universelle et effet attendu de chacun des constituants

Composition		Antiseptiques neutralisés par l'ingrédient
Lécithine d'œuf	3 g	CH, BC, TRI
Polysorbate 80	30 mL	CH, BC, TRI
Thiosulfate de sodium	5 g	PVP-I
L-histidine	1g	Aldéhydes
Bouillon MH2	qsp 1L	

CH : chlorhexidine digluconate ; BC : chlorure de benzalkonium ; TRI : triclosan ; PVP-I : povidone iodée.

3.4. Déroulement du protocole

Les modes opératoires du protocole de dilution/neutralisation et des vérifications faites en parallèle sont détaillés dans la Figure 11. Au total, 5 temps de contact ont été testés pour chaque antiseptique et pour les 8 souches concernées (Tableau 6). La précocité de l'effet bactéricide était évaluée avec les temps de contact à 5 et 10 minutes. La sélection de souches résistantes était vérifiée par le temps de contact 24h qui permettait d'objectiver une reprise de croissance bactérienne éventuelle.

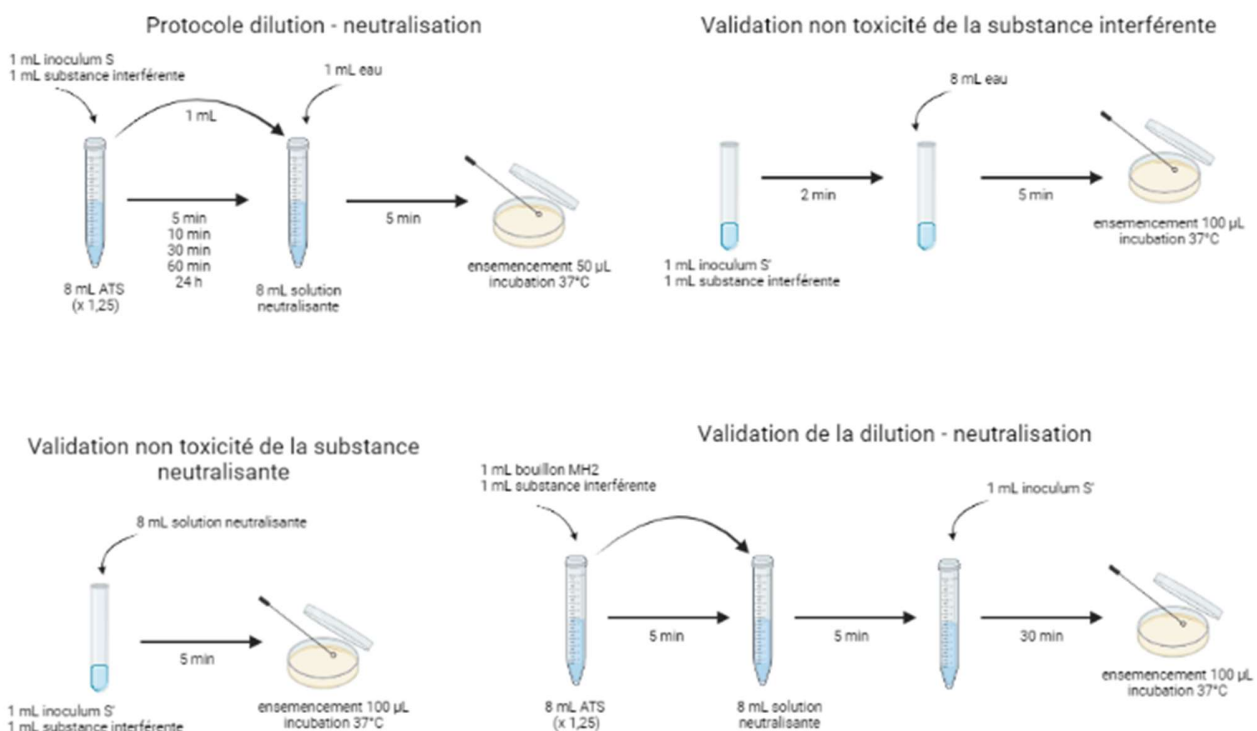


Figure 11 : Protocole de dilution neutralisation pour l'efficacité des antiseptiques, dérivé de la norme NF EN 13727 pour l'évaluation de l'efficacité bactéricide en médecine.

3.5. Critères d'évaluation de l'essai

Afin de valider sans équivoque l'action de l'antiseptique, les préparations annexes ont été testées séparément pour leur innocuité sur la suspension bactérienne. L'efficacité de neutralisation a également été testée pour s'assurer qu'à l'ajout de cette substance au temps imparti, aucune activité résiduelle de l'antiseptique n'était

observée, permettant ainsi de garantir la pertinence de la notion de « temps de contact ». Les critères de validation de chacun des tests sont présentés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Critères de validation de l'essai de bactéricidie d'un antiseptique selon les normes NF EN 1276 et 13727.

Tests témoins	Critères normatifs de conformité
Innocuité de la substance interférente	Réduction de moins de 5% du nombre de bactéries viables
Innocuité du neutralisant	Réduction de moins de 5% du nombre de bactéries viables
Efficacité du neutralisant	Réduction de moins de 2,5% du nombre de bactéries viables
Bactéricidie de l'antiseptique	Réduction d'au moins 10^5 du nombre de bactéries viables présentes dans l'inoculum initial

4. Détermination des CMI, CMB et CSI

Cette partie méthodologique est détaillée dans l'article n°1 présenté dans l'axe n°2. La détermination des CMI a été réalisée par microdilution en milieu liquide selon les recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) et suivant le mode opératoire décrit par Wiegand *et al.* [121]. La lecture manuelle des CMI était faite à 24h et 48h et correspondait à la plus faible concentration d'antiseptique pour laquelle aucune croissance bactérienne n'était observée à l'œil nu. La CMB était déterminée à 24h et correspondait à la concentration d'antiseptique pour laquelle moins de 0,1% de bactéries survivantes étaient observées, soit une réduction de 3 Log_{10} de l'inoculum initial. Le stress antiseptique a été défini comme correspondant à la CSI, soit la concentration la plus forte qui n'affecte pas significativement la cinétique de croissance bactérienne. En pratique, la CSI d'un antiseptique donné pour une souche donnée correspondait à celle pour laquelle la courbe de croissance se superposait le mieux à la courbe de croissance sans antiseptique.

5. Vitesse de bactéricidie de la chlorhexidine

Des essais de vitesse de bactéricidie ont été effectués avec la chlorhexidine sur les 4 souches de *E. faecium*. Les essais sur les mutants isogéniques ont été réalisés ultérieurement à ceux faits sur la souche native Aus0004 en raison du délai de réalisation des constructions. Comme déjà évoqué, pour des questions de fluidité de lecture, l'ensemble des résultats est présenté ici. La priorité a été donnée à la chlorhexidine pour

la réalisation de ces essais chronophages en raison de son usage fréquent en pratique clinique et de l'impact de sa présence sur l'expression de sARN de *E. faecium* (voir Article n°1 présenté dans l'axe n°2). Pour cela, une suspension bactérienne était préparée dans du bouillon BHI (\pm supplémenté en spectinomycine à 300 mg/L) et ajustée à une $DO_{600} = 0,1$. La chlorhexidine à 4 mg/L et 2 mg/L (correspondant à $1 \times$ et $0,5 \times$ CMI) était ajoutée au début de la croissance. Le suivi de la bactéricidie était effectué par mesure des DO_{600} ainsi que par dénombrement bactérien, toutes les heures pendant 5 heures.

Résultats

1. Bactéricidie efficace sur critères de la norme NF EN 13727

Le dénombrement de l'inoculum bactérien standardisé à $DO_{600} = 0,3$ a confirmé une densité bactérienne de départ de l'ordre de 3×10^8 UFC/mL. L'absence de lyse bactérienne au contact de la substance interférente et de la solution neutralisante a permis de valider l'essai, de même que l'efficacité de la solution neutralisante pour inactiver l'antiseptique à l'issue du temps de contact défini.

Les quatre antiseptiques ont répondu aux critères de bactéricidie définis par la norme sur *E. faecium* Aus0004 et sur toutes les souches de *S. aureus* de l'étude. Les essais ont montré une stérilisation dès 5 minutes de contact pour tous les antiseptiques. Aucune reprise de croissance n'a été observée à 60 minutes ni après 24 heures de temps de contact. Aucune différence phénotypique n'a été mise en évidence entre les souches natives et les souches mutées de *S. aureus*.

2. CMI, CMB, CSI et vitesse de bactéricidie

Les résultats obtenus avec les souches de référence *E. faecium* Aus0004 et *S. aureus* HG003 ont été présentés en communication écrite au congrès de l'ECCMID (European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases) en 2019 (Annexe 2) et ont fait l'objet d'une publication scientifique en 2021 dans le journal Scientific Reports présentée dans l'axe n°2.

En plus des résultats publiés sur les souches natives, une partie des souches délétées a été testée dont la liste est rappelée dans le Tableau 6. Les résultats sont présentés dans le Tableau 11. Pour les essais de détermination de CMI et de CSI, aucune différence significative entre les souches natives et les souches délétées de sARN n'a pu être mise en évidence chez *S. aureus*, ni chez *E. faecium*. Lorsqu'elle était déterminée, la CMB pour les mutants isogéniques était également identiques à celle de leur souche native. Devant l'absence de phénotypes des mutants de *S. aureus* en présence d'un stress antiseptique, 3 des 6 sARN initialement choisis ont été sélectionnés pour les expérimentations ultérieures : ARNIII, SprX, et SprD

en raison de leur fonction connue jugée pertinente pour l'étude de l'adaptation en stress antiseptique. La totalité des sARN de *E. faecium* a été conservée afin de poursuivre leur caractérisation et la collecte d'un maximum de données.

Tableau 11 : Récapitulatif des résultats de CMI et CSI déterminées pour les souches de *S. aureus* et *E. faecium*.

	CMI/ CSI (mg/L)			
	Chlorhexidine	Chlorure de benzalkonium	PVP-iodée	triclosan
S. aureus N = 8				
HG003	2 / 1	2 / 1	2048 / 1024	2 / 0,016
HG001	2 / 1	1 / 1	2048 / 1024	1 / 0,016
HG003ΔSprC	2 / 1	2 / 1	2048 / 1024	2 / 0,016
HG003ΔSprD	2 / 1	2 / 1	2048 / 1024	2 / 0,016
HG003ΔSprG1/SprF1	2 / 1	2 / 1	2048 / 1024	2 / 0,016
HG003ΔARNIII	2 / 1	2 / 1	2048 / 1024	2 / 0,016
HG003ΔSprB	2 / 1	2 / 1	2048 / 1024	2 / 0,016
HG001ΔSprX	2 / 1	1 / 1	2048 / 1024	1 / 0,016
E. faecium N = 4				
Aus0004	4 / 0,5	4 / 2	2048 / 1024	8 / 0,25
Aus0004Δern0160	4 / 0,5	4-8 / 2	2048 / 1024	8 / 0,25
Aus0004Δern0160_pAT29*	4 / 0,5	4 / 1-2	2048 / 1024-512	8 / 0,25
Aus0004Δern0160_pAT29Ωern0160*	4 / 0,5	4 / 1-2	2048 / 1024-512	8 / 0,25

CMI déterminées en milieu MH2, CSI déterminées en milieu BHI. *milieu supplémenté en spectinomycine à 300 mg/L

Concernant la vitesse de bactéricidie de la chlorhexidine sur *E. faecium*, aucune variation significative n'a été constatée entre les souches avec et sans expression de *ern0160*. Cependant, l'interprétation n'a pu être basée que sur les données d'absorbance. En effet, les dénombrements bactériens ont présenté de nombreuses incohérences, probablement en raison de la non-neutralisation de l'antiseptique avant étalement sur géloses. Cette neutralisation n'avait pas été effectuée du fait de la faible concentration de chlorhexidine présente en solution par rapport à celles utilisées dans l'essai normatif (2 et 4 mg/L contre 6,25 g/L). Cette étape semble toutefois indispensable quelle que soit la concentration d'antiseptique utilisée, ce d'autant plus que la chlorhexidine présente un effet rémanent.

AXE N°2 : ETUDE DE L'IMPACT DU STRESS ANTISEPTIQUE
SUR LA REponse MEDIEE PAR LES sARN

Comme évoqué précédemment, *S. aureus* et *E. faecium* sont des pathogènes opportunistes de l'Homme vivant respectivement au niveau de la peau et du tube digestif. Ces compartiments biologiques sont diamétralement opposés en termes de probabilité d'exposition au milieu extérieur et *E. faecium* semble ainsi protégé d'une exposition aux antiseptiques et désinfectants. En revanche, dans le milieu extérieur, notamment dans l'environnement hospitalier, ces deux bactéries sont très probablement exposées aux résidus d'antiseptiques et de désinfectants et doivent s'adapter à ces conditions défavorables. Il est maintenant établi que les sARN jouent un rôle clé dans l'adaptation rapide des bactéries aux changements environnementaux. Certains d'entre eux ont même été directement reliés à la réponse au stress antibiotique [105, 110, 122]. Par analogie, nous avons souhaité évaluer la réponse au stress antiseptique médiée par les sARN en caractérisant l'impact d'une pression antiseptique sur leurs profils d'expression.

Présentation de l'article n°1

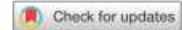
Dans cette publication, les résultats présentés montraient que l'espèce *E. faecium* avait des CMI_{48h} systématiquement plus élevées que *S. aureus* : d'un facteur 2 pour CH et BC et d'un facteur 4 pour TRI. Ces résultats suggéraient une sensibilité réduite de *E. faecium* aux antiseptiques, conformément à ses capacités globales de survie en conditions défavorables. Les CMI_{48h} de PVP-I étaient identiques pour les deux bactéries, avec des valeurs beaucoup plus élevées que celles des autres molécules. De façon similaire, *E. faecium* présentait des CSI plus élevées que *S. aureus* pour BC et TRI et les CSI de la PVP-I étaient identiques pour les deux bactéries et là-encore très élevées. En revanche, les CSI de CH étaient plus faibles pour *E. faecium* que pour *S. aureus*.

Sur la base de l'étude des profils des courbes de croissance en présence d'un gradient antiseptique, deux cinétiques d'action distinctes ont été mises en évidence : CH, BC et PVP-I ont révélé une activité « on/off »

alors que TRI a montré un gradient « effet-dose » avec une récupération progressive de la croissance bactérienne au fur et à mesure de la dilution de TRI.

Enfin, nous avons mis en évidence que l'exposition des souches *E. faecium* Aus0004 et *S. aureus* HG003 aux CSI de biocides conduisait à une altération de plusieurs profils d'expression des sARN, la plupart réprimés.

1. Article n°1, Scientific Reports, 2021



OPEN Distinct expression profiles of regulatory RNAs in the response to biocides in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium*

Loren Dejoies^{1,2}, Killian Le Neindre^{1,2}, Sophie Reissier², Brice Felden^{2,3} & Vincent Cattoir^{1,2,3}

The aim of the study was to characterize the antimicrobial activity of clinically-relevant biocides (chlorhexidine digluconate, benzalkonium chloride, PVP-iodine and triclosan) and to determine the sRNA expression profiles under biocide exposure in two major bacterial opportunistic pathogens, *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus*. In vitro activities were evaluated against *S. aureus* HG003 and *E. faecium* Aus0004. We determined MIC, MBC, sub-inhibitory concentrations (SIC) and growth curves under SIC conditions. sRNA expression study under SIC exposure of biocides was performed by RT-qPCR on 3 sRNAs expressed in *S. aureus* (RNAIII, SprD and SprX) and the first 9 sRNAs identified as expressed in *E. faecium*. MICs were higher against *E. faecium* than for *S. aureus*. Growth curves under increasing biocide concentrations highlighted two types of bactericidal activity: "on/off" effect for chlorhexidine, benzalkonium chloride, PVP-iodine and a "concentration-dependent" activity for triclosan. Exposure to biocide SICs led to an alteration of several sRNA expression profiles, mostly repressed. The distinct biocide activity profiles must be evaluated with other compounds and bacterial species to enrich the prediction of resistance risks associated with biocide usage. Biocide exposure induces various sRNA-mediated responses in both *S. aureus* and *E. faecium*, and further investigations are needed to decipher sRNA-driven regulatory networks.

Resistance to antibiotics keeps increasing worldwide and can lead to treatment failures of severe bacterial infections. "ESKAPE" pathogens include healthcare-relevant Gram-positive and Gram-negative bacteria displaying high capacities for acquisition of resistance determinants, and causing numerous multi-drug resistant (MDR) infections worldwide¹. *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* are two Gram-positive bacteria represented in this ESKAPE group and stand as major human nosocomial pathogens². Searching for novel antimicrobial strategies is essential, but must not be the only option to struggle against infections. Indeed, limiting their occurrence, notably hospital-acquired infections can be achievable with appliance of rigorous hygiene practices in healthcare units. To fulfill these objectives, biocides (incl. antiseptics, disinfectants) are massively used at the hospitals^{3,4}. They also include preservative agents and are therefore widely used in industries (e.g. food, cosmetics). As a consequence, the bioaccumulation of various biocides in the environment (food, water, soils) has been evidenced⁵, and some of them, such as triclosan, have been detected in human urine and breast milk^{6,7}. Nevertheless, the widespread use of biocides based on clinically-evidenced antimicrobial efficacy is in contrast with the lack of knowledge about their molecular mechanisms of action and resistance. Some are predicted to share common targets with antibiotics, such as cell membranes (chlorhexidine, benzalkonium chloride), while halogen-based biocides (PVP-iodine, triclosan) could have a global antimicrobial effect by inducing an oxidative stress in bacterial cell after passive diffusion through cell membrane^{8,9}. In a context of global health concern, the exacerbation of emerging antimicrobial resistance after overuse and/or misuse of biocides has been hypothesized¹⁰. Indeed, evidences for a link between heavy usage of biocides and emergence of antibiotic resistance are currently highlighted, even though the molecular mechanisms are partially elucidated^{11–16}. Furthermore, official guidelines in biocide susceptibility testing are still pending, despite recent propositions have led significant advances in the standardization of procedures^{17,18}. As a consequence, the high variability of published results related to different procedures contributes to the misunderstanding of cross-/co-resistance mechanisms. Among various

¹Department of Clinical Microbiology, Rennes University Hospital, Rennes, France. ²Inserm UMR_S 1230, Bacterial Regulatory RNAs and Medicine, University of Rennes 1, Rennes, France. ³National Reference Center for Antimicrobial Resistance (Lab 'Enterococci'), Rennes, France. ✉email: bfelden@univ-rennes1.fr; vincent.cattoir@chu-rennes.fr

	<i>S. aureus</i> HG003				<i>E. faecium</i> Aus004			
	CA-MHB medium		BHI medium		CA-MHB medium		BHI medium	
	MIC _{48h} (mg/L)	MBC _{24h} (mg/L)	MBC/MIC ratio	SIC (mg/L)	MIC _{48h} (mg/L)	MBC _{24h} (mg/L)	MBC/MIC ratio	SIC (mg/L)
Chlorhexidine digluconate	2	4	2	1	4	4	1	0.5
Benzalkonium chloride	2	8	4	1	4	8	2	2
Triclosan	2	8	4	0.016	8	16	2	0.25
PVP-iodine	2048	2048	1	1024	2048	2048	1	1024

Table 1. Antimicrobial activities of chlorhexidine digluconate, benzalkonium chloride, triclosan and PVP-iodine on *S. aureus* HG003 and *E. faecium* Aus004. CA-MHB: cat.on-adjusted Mueller–Hinton broth; BHI: Brain Heart Infusion; MIC_{48h}: minimal inhibitory concentrations after 48 h of incubation; MBC_{24h}: minimal bactericidal concentrations after 24 h of incubation; SIC: sub-inhibitory concentration.

strategies triggered by bacteria to cope with environmental changes, regulatory RNAs (sRNAs) are key players among intertwined regulatory networks that mediate dynamic adaptations by modulating gene expression^{19,20}. Bacterial adaptation mediated by sRNAs has been exclusively studied under antibiotic conditions^{21,22}, but we presume that a biocide stress, especially at subinhibitory concentrations (SICs, concentrations below the MIC, which do not affect bacterial growth), could trigger sRNA-regulated metabolic pathways as well. Among Gram-positive human pathogens, sRNAs have been studied in *S. aureus*, with an estimated number close to 50 *bona fide* sRNAs²³. Among them, three can be qualified as “clinically-relevant”: RNAIII, implicated into the quorum sensing, allowing the transition between expression of adhesive and colonization factors²⁴, SprX that contributes to glycopeptide resistance by repressing stage V sporulation protein (spoVG) expression²⁵, and SprD that regulates expression of an immune evasion protein (Sbi) and is required for infection on animal models²⁶. In *Enterococcus* spp., sRNAs have been first described in *Enterococcus faecalis*^{27,28}. In *E. faecium*, the first nine sRNAs whose biological functions remain unknown have been recently discovered in our lab²⁹.

In this study, we aimed to characterize the antimicrobial activity of four clinically-relevant biocides (chlorhexidine digluconate, benzalkonium chloride, PVP-iodine and triclosan), and to determine the sRNA expression profiles under biocide stress in two major ESKAPE Gram-positive pathogens, *E. faecium* and *S. aureus*. For this aim, we developed different approaches to assess the behavior of those bacteria under biocidal exposure.

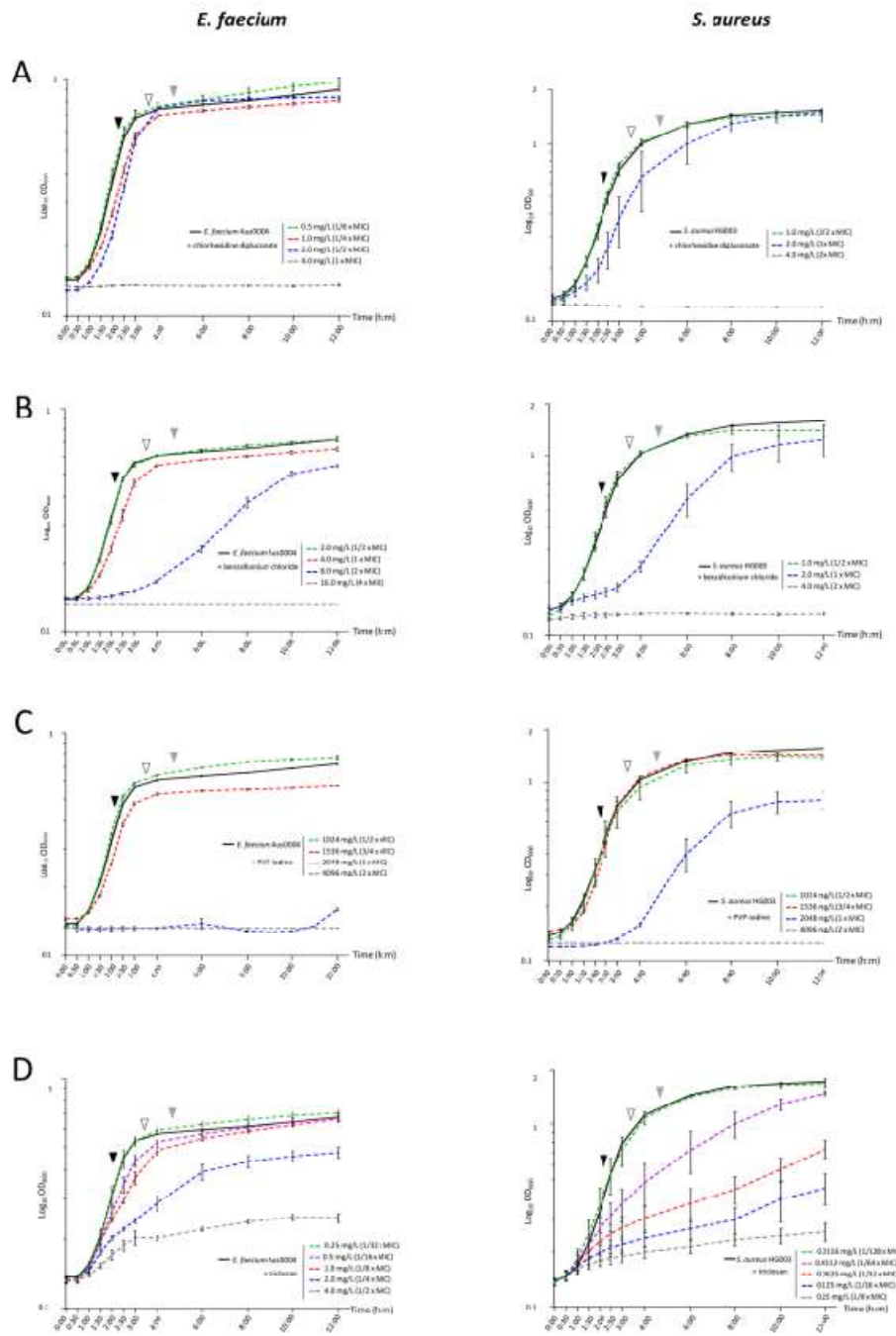
Results

Biocide susceptibility testing. MICs of chlorhexidine digluconate and benzalkonium chloride were two-fold higher against *E. faecium* than *S. aureus* (4 mg/L and 2 mg/L, respectively), while MICs of triclosan were four-fold higher (8 mg/L and 2 mg/L, respectively) (Table 1). By contrast, MICs of PVP-iodine were identical for both species and 1000-fold higher than the other biocides (2048 mg/L). MBC/MIC ratios of the four tested biocides suggested a bactericidal activity against both *E. faecium* and *S. aureus* (ratio ≤ 4) (Table 1)⁸.

Bacterial growth under gradient concentrations of biocide revealed that SIC of benzalkonium chloride and triclosan were higher for *E. faecium* than for *S. aureus*, whereas SIC of chlorhexidine digluconate was higher for *S. aureus* than for *E. faecium*. PVP-iodine SICs were identical for both bacteria and were again about 1000 times higher than the three other biocides (Table 1).

Antibacterial activity profiles. SICs of chlorhexidine digluconate, benzalkonium chloride and PVP-iodine were reached at 1/2 × MIC for *S. aureus*, as well as for *E. faecium* except with chlorhexidine digluconate (SIC at 1/8 × MIC). SICs of triclosan were much lower than MICs at 1/32 × and 1/128 × MIC for *E. faecium* and *S. aureus*, respectively (Fig. 1 and Table 1). This difference between chlorhexidine, benzalkonium chloride and PVP-iodine in one side, and for triclosan on another was also detected after the analysis of the growth curves. Indeed, two profiles of antibacterial activity were highlighted: chlorhexidine digluconate, benzalkonium chloride and PVP-iodine revealed a weak concentration-dependant activity illustrated by an “on/off” effect on bacterial growth between 1 two-fold dilution. Triclosan revealed a strong concentration-dependent activity resulting in the gradual inhibition of bacterial growth while biocide concentrations increased (Fig. 1).

Overall repression of *E. faecium* sRNAs expression under biocide exposure. Expression profiles of sRNA under each biocide condition are presented in Fig. 2A and Table S1. No significant shifts at the transcript level were observed at the ME phase, except for sRNA_0160 under triclosan (+151; $P=0.0008$). During the later stages, a global repressive trend of sRNAs steady state expression levels was observed. At the LE phase, their expression profiles were similar under chlorhexidine, benzalkonium chloride and triclosan exposure, with a significant decrease of expression for four sRNAs (sRNA_0120, sRNA_0160, sRNA_0280 and sRNA_2210). Besides, sRNA_1300 expression was repressed only under chlorhexidine, while sRNA_0030 expression was repressed only under triclosan. At the ES phase, the expression of some sRNAs was significantly decreased under chlorhexidine (4 out of 9) and benzalkonium chloride (8 out of 9), and the expression of all 9 sRNAs was switched off under triclosan, notably with sRNA_0160 and sRNA_0280 practically extinct (−45,175; $P<0.0001$ and −1009; $P=0.0002$ respectively). Interestingly, no significant shifts were observed under PVP-iodine at none of the three growth stages.



«con / off» activity
«concentration-dependent» activity

Figure 1. Growth kinetics of *E. faecium* Aus0004 (left panels) and *S. aureus* HG003 (right panels) under gradients of chlorhexidine (range from 0.5 to 4.0 mg/L) (A), benzalkonium chloride (range from 0.0156 to 16.0 mg/L) (B), PVP-iodine (range from 1024 to 4096 mg/L) (C) and triclosan (range from 0.0156 to 4 mg/L) (D). Growth curves under sub-inhibitory concentrations (SICs), defined as the highest concentration of biocide for which the standard deviation of the growth curve overlapped with the one of the biocide-free control, are represented in green dashed line. Growth stages considered for sRNA expression corresponded to mid (ME, full black triangle), late (LE, empty black triangle) exponential growth and early stationary (ES, full grey triangle) phases. Error bars indicate standard deviations from three independent experiments.

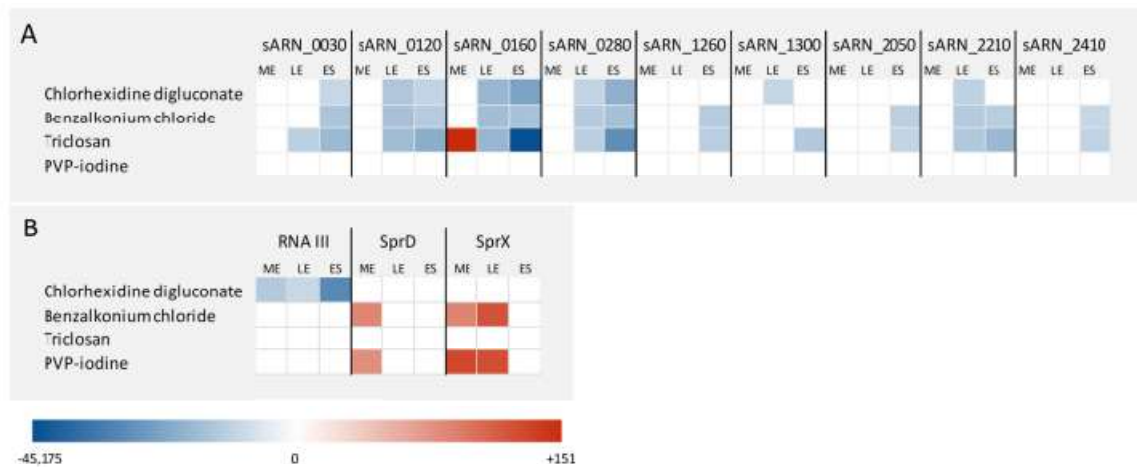


Figure 2. Heat maps illustrating variations in sRNA expression of *E. faecium* Aus0004 (A) and *S. aureus* HG003 (B) at mid exponential, late exponential and early stationary growth phases after exposure to SICs of chlorhexidine digluconate, benzalkonium chloride, PVP-iodine and triclosan. RNA counts were normalized against house-keeping genes (*trnRNA* for *S. aureus* and *adk* for *E. faecium*) using the comparative cycle threshold $\Delta\Delta Ct$ method and are expressed in Log_2 fold change. Non-significant shifts in sRNA expression appear in white, significant induction ($P < 0.05$) appears in red, significant repression ($P < 0.05$) are in blue.

Impacts of biocide exposure onto *S. aureus* sRNAs expression. sRNA expression profiles under each biocide condition are presented on Fig. 2B and Table S2. RNAPIII expression profile was significantly influenced ($P < 0.05$) only under chlorhexidine digluconate SIC. Its expression was slightly repressed at ME and LE stages (-26.8 ; $P = 0.04$ and -10.6 ; $P = 0.0008$ respectively), and mostly at the ES phase (-1310 ; $P = 0.04$). SprX expression profile was altered under two biocides. We observed an increase of expression at the ME and LE stages, then return to normalcy at the DS stage under SICs of benzalkonium chloride ($+18.6$; $P = 0.02$, $+57.9$; $P = 0.04$, $+1.6$; $P > 0.05$) and PVP-iodine ($+77.6$; $P = 0.02$, $+66.2$; $P = 0.001$, $+4.9$; $P > 0.05$). SprD expression showed significant shifts under SICs of benzalkonium chloride ($+18.2$; $P = 0.003$) and PVP-iodine ($+14.7$; $P = 0.003$) only at the ME stage. A triclosan exposure did not lead to significant changes in the expression profiles of RNAPIII, SprX and SprD.

Discussion

As expected, the four biocides tested here possessed a potent antimicrobial efficacy and revealed a bactericidal action against both *E. faecium* and *S. aureus* strains (MBC/MIC ratios ≤ 4)³⁰. The antimicrobial activity of high biocide concentrations found in commercial products (at least at 100-times the MICs) was not investigated in this study because we assessed the effects of low concentrations, mimicking those detected in the environment after their usual uses and misuses. The higher MIC values of chlorhexidine gluconate, benzalkonium chloride and triclosan measured for *E. faecium* suggest a reduced susceptibility to biocides as compared to *S. aureus*. These results are consistent with inherent ability of *Enterococcus* spp. to cope with antimicrobial stress³¹, even if they are unlikely exposed to biocides as part of the gastro-intestinal flora, by contrast with *S. aureus* and its curaneous tropism. These results showing higher MICs in *Enterococcus* spp are consistent with other studies^{18,32}. MIC values are in similar ranges and about 2- to 4-times higher in *E. faecium* than in *S. aureus* for every biocide, except for triclosan for which MIC value in *S. aureus* determined in our study is 16- to 30-times higher than in other studies^{18,32}. This discrepancy reveals how raw values can be hardly comparable from one study to another due to a large variability in protocols and interpretation criteria, in addition to intrinsic differences between the tested strains. Indeed, the detection of non-susceptible isolates can fluctuate depending on methodologies used for data acquisition and interpretation. Also, standard protocols to assess the impacts of biocides on bacterial resistance onset are lacking. These major methodological issues were pointed out in 2009 by the Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) which recommended standardized methodologies and international surveillance programs to monitor the emergence of biocide resistance (https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_021.pdf). From there, increasing scientific investigations have led to practical propositions about standardization of biocide susceptibility testing and epidemiological cut-off assessments^{17,18}.

Regrettably, we were unable to analyse the MIC/MBC and the SIC data altogether because the culture media were different between the experiments. Indeed, BHI medium was used to perform the biocide stress characterization experiment under sub-lethal biocide concentration because no exploitable data were collected in CA-MHB medium.

Based on the analysis of growth curves under sub-lethal conditions, we enlightened two distinct profiles of antimicrobial activity, independently from their bacterial targets. Chlorhexidine digluconate and benzalkonium

chloride, both responsible for bacterial membranes disruption^{8,9}, as well as PVP-iodine inducing an oxidative stress^{8,9}, displayed a weak concentration-dependent effect mimicking an “on–off” effect. These results strengthen the need of concentrated commercial products in clinical use to ensure an optimal antimicrobial activity for these compounds. It also reinforces the hypothesis of a global antibacterial action of these molecules that potentially target numerous molecular components of bacterial cells simultaneously⁹. Triclosan is the only biocide included in our study that displayed a strong concentration-dependent activity. Noteworthy, it is also the only biocide of our panel for which a molecular target is known. Triclosan inhibits lipid synthesis by targeting the enoyl reductase, an essential enzyme involved in the fatty acids elongation cycle, demonstrated in *Escherichia coli* (FabI enzyme) and in *Mycobacterium smegmatis* (InhA enzyme)¹¹. We hypothesize that triclosan acts similarly in both *S. aureus* and *E. faecium* as an antibiotic analog by binding to specific molecular target(s) in agreement with its antibacterial effect that is strongly concentration-dependent.

In this report, we investigated, for the first time, if biocides could influence sRNA expression in two bacterial pathogens, reasoning that biocides are environmental stresses that could be sensed and detected by sRNA-associated gene regulatory networks, to cope with the trigger. sRNA expression study on both *S. aureus* (3 sRNAs), and *E. faecium* (9 sRNAs) in the presence/absence of biocide SIC, revealed that expression levels of several sRNAs is strongly reduced as a result of biocide SIC exposure, although the roles of and the mechanisms connecting those RNAs with the response of bacteria to biocide is unknown. The sRNAs from *S. aureus* were selected among dozens of expressed sRNA in this bacterium (<http://srd.genoues.org/>)³³ because of their implications in either bacterial virulence (SprD, RNAIII) or antibiotic resistance (SprX)^{24–26}. Under biocides conditions, RNAIII and SprX were significantly under- and over-expressed depending of the growth stages. Owing to the large number of regulatory functions of RNAIII²⁴, its under-expression under chlorhexidine exposure could globally alter the quorum sensing network since RNAIII is the effector. SprX transcript levels followed a similar kinetic under benzalkonium chloride and PVP-iodine, with initial over-expression before returning to normal at the stationary phase. Thus, SprX is implicated into the response towards several antimicrobials targeting cell wall, such as glycopeptides²⁵, benzalkonium chloride (this study) or intracellular components as PVP-iodine (this study). The biological functions of sRNAs recently described as expressed in *E. faecium*²⁹ are still under investigations but they could possibly be implicated in gene regulatory networks after a biocide stress is applied and sensed. Among the nine studied sRNAs, sRNA_0160 is a leading candidate due to its substantial repression under chlorhexidine digluconate, benzalkonium chloride, and mostly under triclosan. Furthermore, a previous study showed that sRNA_0160 expression level was significantly downregulated under SIC exposure of daptonycin, an antibiotic targeting the cell wall²⁹. Taken together, it suggests that this sRNA would be connected to both the antibiotic and biocide responses in *E. faecium*, and a deeper understanding of its mechanisms of action would benefit to both fields.

Based on these results, we noticed that sRNA-mediated responses after exposure to four different biocides are distinct between *E. faecium* and *S. aureus*. Indeed, triclosan exposure did not lead to significant alteration of sRNAs expression in *S. aureus*, although it was related to an overall repression of sRNAs expression in *E. faecium*. By contrast, PVP-iodine modified SprX expression in *S. aureus*, but did not influence sRNA expression levels in *E. faecium*. These results show that biocide exposure induces different sRNA mediated responses for optimal fitness between the bacterial species. Noteworthy, part of the difference in the transcriptomic response observed between the two strains could be related to their different genetic backgrounds. Indeed, *E. faecium* Aus0004 is a multi-drug resistant isolate³⁴ whereas *S. aureus* HG003 is a methicillin-susceptible strain³⁵ so that we could hypothesize that the adaptation steps necessary for *E. faecium* to become resistant to antimicrobials could lead to a cross- or a co-resistance selection to biocides. In addition, the expression of a given sRNA can be unchanged, repressed or increased depending on which biocide is used. Furthermore, we should extend our investigations in other bacterial pathogens that may reveal specific variations into their overall sRNA contents under biocides sub-lethal conditions. Likewise, further investigations regarding the functions, mechanisms and molecular targets of these biocide-responding sRNAs are needed to a better understanding of what appear to be complex sRNA-driven regulatory networks allowing biocide adaptation of bacterial pathogens to the presence of biocides into the environment.

Methods

Bacterial strains. The *E. faecium* Aus0004 reference strain, isolated from the bloodstream of a patient in Melbourne in 1998, was selected³⁴. It is a vancomycin-resistant (*vanB*) strain belonging to clade A1 that is widely prevalent in healthcare facilities across the world³⁶. Its genome was sequenced and annotated in 2003 (Genbank accession no. CP003351). The reference strain of *S. aureus* was HG003, described as a model strain for physiology and mechanistic studies³⁷. It is derived from *S. aureus* NCTC 8325 (Genbank accession no. NC_007795) that was isolated in 1960 from a septic patient and sequenced in 2001³⁸.

Biocides. Four clinically-relevant biocides were studied: chlorhexidine digluconate, benzalkonium chloride, PVP-iodine and triclosan (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Chlorhexidine digluconate, benzalkonium chloride and PVP-iodine stock solutions (4096 mg/L) were prepared in sterile water and stocked at 4 ± 2 °C until use. Triclosan powder, poorly soluble in water, was diluted in ethanol (EtOH) 60% solvent and freshly prepared at each assay. The suitability of EtOH 60% solvent was confirmed by innocuity testing (data not shown). Dilutions were prepared from stock solutions in culture media adapted to the experiments: cation-adjusted Mueller–Hinton broth (CA-MHB) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) for MICs and MBCs assays, brain–heart infusion (BHI) broth (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) for sub-lethal conditions assays, and bacterial cultures for RNA isolation.

Antimicrobial activity testing. MICs were determined by the broth microdilution (BMD) method in CA-MHB medium after 24 and 48 h incubation at 35 ± 2 °C. Standardized inocula and step-dilutions of biocides were derived from EUCAST recommendations for antibiotic susceptibility testing³⁶. MBCs were determined by sub-culturing on Mueller-Hinton agar plates the wells of MIC plate exhibiting bacterial growth inhibition after 24 h of incubation and were defined as the lowest concentration of biocide that reduces the initial bacterial inoculum by $\geq 99.9\%$ (i.e., -3 Log_{10}). Each assay was performed at least in triplicate.

For biocide stress characterization, bacterial strains were exposed to sub-lethal concentrations of biocides. No bacterial growth was observed in microplates in CA-MHB medium therefore, the experiment was performed in BHI medium. Standardized bacterial suspensions in BHI medium were exposed to a biocide gradient (from $1 \times$ to $1/128 \times$ MIC) at 37 °C without agitation for 12 h. Optical density at 600 nm (OD_{600}) was measured at 30-min intervals using a Synergy 2 multi-mode reader (Biotek). The reliability between OD variations and bacterial growth has been assessed by a positive correlation between OD values and CFU/mL in BHI medium without biocide ($R_{\text{pearson}}^2 > 0.9$) and by the absence of interference of biocide in BHI medium on OD values. Each assay was performed at least in triplicate. Growth curves were represented with the GraphPad Prism software v5.0 (San Diego, CA, USA). Sub-inhibitory concentrations (SIC) corresponded to the highest concentration of biocide for which the standard deviation of the growth curve overlapped with the one of the biocide-free control.

Bacterial Cultures, RNA Isolation, and Expression Analysis. *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* strains were grown in BHI medium and then harvested at three different growth stages (mid-exponential [ME], late exponential [LE] and early stationary [ES]) that were determined at 2:15, 3:30 and 4:45 of growth time respectively. Cells were isolated by centrifugation and dissolved in a solution of 33 mM sodium acetate, 17 mM sodium dodecyl sulfate, and 1 mM EDTA (pH 5.5). The cells were then mixed with glass beads and lysed by using a Fast Prep instrument (MP Biochemicals, LLC, Santa Ana, CA, USA).

Total RNAs were isolated by using water-saturated phenol (pH 5.0). RNAs were precipitated and washed with ethanol. Depletion of residual DNA was performed using the TURBO DNA-free kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific). Three independent experiments were performed, with independent RNA purifications.

Expression levels of regulatory RNAs in strains were monitored by using a 2 step quantitative reverse transcription PCR. Briefly, cDNAs were produced by using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) and amplified by using SYBR Green (Power SYBR™ Green PCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific) and specific primers, as previously described^{25,26,29}. Regulatory RNA counts were normalized against house-keeping genes (*tmrRNA* for *S. aureus*, and *adk* for *E. faecium*) using the comparative cycle threshold $\Delta\Delta\text{Ct}$ method³⁹. Statistical t-test was performed to analyse the ΔCt under biocide condition compared to the control condition, as described⁴⁰. Fold-differences calculated using the $\Delta\Delta\text{CT}$ method were expressed as a range, with incorporation of the standard deviation of the $\Delta\Delta\text{CT}$ value into the fold-difference calculation.

Received: 14 August 2020; Accepted: 5 March 2021

Published online: 25 March 2021

References

- Rice, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *J. Infect. Dis.* **197**, 1079–1081 (2008).
- Taconelli, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **18**, 318–327 (2018).
- SF2H. Gestion pré-opératoire du risque infectieux. Conférence de consensus 2004 actualisée en 2013. 2013.
- Fraiese, A. P. Choosing disinfectants. *J. Hosp. Infect.* **43**, 255–264 (1999).
- Gaze, W. H., Abdoulsam, N., Hawkey, P. M. & Wellington, E. M. H. Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1802–1807 (2005).
- Dhillon, G. et al. Triclosan: Current Status, Occurrence, environmental risks and bioaccumulation potential. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **12**, 5657–5684 (2015).
- Adolfsson-Erdic, M., Pettersson, M., Parkkonen, J. & Sturve, J. Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere* **46**, 1485–1489 (2002).
- Fleurette J, Freney J, Everdy ME. Antiseptie et désinfection. ESKA, 1995: 155–168.; 1995.
- Lorian, V. *Antibiotics in laboratory medicine* 5th edn. (Lippincott Williams & Wilkins, 2005).
- Maillard, J.-Y. et al. Does microbicide use in consumer products promote antimicrobial resistance? A critical review and recommendations for a cohesive approach to risk assessment. *Microb. Drug Resist. Larchmt N* **19**, 344–354 (2013).
- McMurry, L. M., McDermott, P. F. & Levy, S. B. Genetic evidence that *InhA* of *Mycobacterium smegmatis* is a target for triclosan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 711–713 (1999).
- Sidhu, M. S., Heir, E., Leegaard, T., Wiger, K. & Holck, A. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with beta-lactamase transposon *Tn552* among clinical staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2797–2803 (2002).
- Chuanchuen, E. et al. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing *MexCD-OprJ*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 428–432 (2001).
- Harkins, C. P. et al. The widespread use of topical antimicrobials enriches for resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from patients with atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* **179**, 951–958 (2018).
- Nicolae Dopcea, G., Dopcea, L., Nanu, A., Diguta, C. & Matei, F. Resistance and cross-resistance in *Staphylococcus* sp. after prolonged exposure to different antiseptics. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **21**, 399–404 (2019).
- Verspecht, T. et al. Development of antiseptic adaptation and cross-adaptation in selected oral pathogens in vitro. *Sci. Rep.* **9**, 8326 (2019).
- Schug, A. R. et al. Biocide susceptibility testing of bacteria: Development of a broth microdilution method. *Vet. Microbiol.* **248**, 108791 (2020).
- Morrissey, I. et al. Evaluation of epidemiological cut off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms. *PLoS ONE* **9**, e86669 (2014).

19. Wagner, E. G. H. & Romby, P. Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it. *Adv. Genet.* **90**, 133–208 (2015).
20. Klein, G. & Raina, S. Small regulatory bacterial RNAs regulating the envelope stress response. *Biochem. Soc. Trans.* **45**, 417–425 (2017).
21. Lalaouna, D., Eyraud, A., Chabelskaya, S., Felden, B. & Massé, E. Regulatory RNAs involved in bacterial antibiotic resistance. *PLoS Pathog.* **10**, e1004299 (2014).
22. Howden, B. P. *et al.* Analysis of the small RNA transcriptional response in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* after antimicrobial exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 3864–3874 (2013).
23. Liu, W. *et al.* Assessment of bona fide sRNAs in *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* **9**, 288 (2018).
24. Bronesky, D. *et al.* *Staphylococcus aureus* RNAIII and its regulator link quorum sensing, stress responses, metabolic adaptation, and regulation of virulence gene expression. *Annu. Rev. Microbiol.* **70**, 299–316 (2016).
25. Eyraud, A., Tattevin, P., Chabelskaya, S. & Felden, B. A small RNA controls a protein regulator involved in antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* **42**, 4892–4905 (2014).
26. Chabelskaya, S., Gallot, O. & Felden, B. A *Staphylococcus aureus* small RNA *s* required for bacterial virulence and regulates the expression of an immune-evasion molecule. *PLoS Pathog.* **6**, e1000927 (2010).
27. Shioya, K. *et al.* Genome-wide identification of small RNAs in the opportunistic pathogen *Enterococcus faecalis* V583. *PLoS ONE* **6**, e23948 (2011).
28. Michaux, C. *et al.* Involvement of *Enterococcus faecalis* small RNAs in stress response and virulence. *Infect. Immun.* **82**, 3599–3611 (2014).
29. Sinel, C. *et al.* Small RNAs in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* involved in daptomycin response and resistance. *Sci. Rep.* **7**, 11067 (2017).
30. Pankey, G. A. & Sabath, L. D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **38**, 864–870 (2004).
31. Guzman Prieto, A. M. *et al.* Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones?. *Front. Microbiol.* **7**, 788 (2016).
32. Koburger, T., Hübner, N.-O., Braun, M., Siebert, J. & Kramer, A. Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 1712–1719 (2010).
33. Sassi, M. *et al.* SRD: a *Staphylococcus* regulatory RNA database. *RNA* **21**, 1002–1017 (2015).
34. Lam, M. M. C. *et al.* Comparative analysis of the first complete *Enterococcus faecium* genome. *J. Bacteriol.* **194**, 2334–2341 (2012).
35. Herbert, S. *et al.* Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infect. Immun.* **78**, 2877–2889 (2010).
36. Lebreton, F. *et al.* Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. *MBio* **4**, e00534-13-e00534-13 (2013).
37. Sassi, M., Felden, B. & Augagneur, Y. Draft genome sequence of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* strain HG003, an NCTC8325 derivative. *Genome Announc.* **2**, e00855-14-e00855-14 (2014).
38. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease (ESCMID). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clin. Microbiol. Infect.* **2003**; **9**: 1–7.
39. Wong, M. L. & Medrano, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* **39**, 75–85 (2005).
40. Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F. & Stewart, C. N. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinf.* **7**, 85 (2006).

Acknowledgements

S.R. is the recipient of a fellowship funded by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). This work was funded by the Agence Nationale pour la Recherche (grant number ANR-15-CE12-0003-01 'sRNA-Fit' to B.F.), by the FRM (grant number DBF20160635724 'Bactéries et champignons face aux antibiotiques et antifongiques' to B.F.; personal grant as a member of the scientific council to V.C.) and by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).

Author contributions

V.C. and B.F. conceived and designed the experiments; L.D., K.L.N. and S.R. performed the experiments; L.D., K.L.N., S.R., B.F. and V.C. analysed the data; V.C. and B.F. contributed with reagents/materials/analysis tools; L.D., B.F. and V.C. wrote the manuscript. All the authors discussed the results and commented on the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86376-y>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to B.F. or V.C.

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

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

Supplementary Information

Table S1. Transcript level variations of 9 regulatory RNAs from *E. faecium* under biocide sub-inhibitory concentrations at three growth stages: mid-exponential, late exponential and early stationary. Significant fold differences are presented in bold characters.

Regulatory sRNA	Fold difference in sRNA relative to untreated			
	Chlorhexidine	Benzalkonium chloride	PVP-iodine	Triclosan
Mid-exponential				
sRNA_0030	-2.4 (-2.5 ; -2.2)	-2.2 (-3.1 ; -1.5)	-1.1 (-1.2 ; 1.1)	-1.8 (-2.4 ; -1.4)
sRNA_0120	-1.9 (-2.3 ; -1.5)	-1.7 (-2.2 ; -1.4)	-2.5 (-16.0 ; 2.6)	-1.1 (-2.0 ; 1.6)
sRNA_0160	-2.6 (-3.4 ; -2.0)	2.5 (1.8 ; 3.5)	-1.1 (-1.6 ; 1.3)	151.1 (92.6 ; 246.6)
sRNA_0280	-1.6 (-2.1 ; -1.2)	-3.2 (-4.2 ; -2.4)	-1.7 (-2.1 ; -1.4)	3.7 (2.2 ; 6.2)
sRNA_1260	-2.3 (-3.3 ; -1.7)	-2.2 (-4.6 ; -1.0)	-2.0 (-3.2 ; -1.2)	-3.1 (-6.1 ; -1.6)
sRNA_1300	-2.0 (-3.7 ; -1.1)	-3.8 (-10.3 ; -1.4)	-1.0 (-1.8 ; 1.7)	3.0 (1.9 ; 4.8)
sRNA_2050	-1.9 (-4.1 ; 1.1)	-2.0 (-6.4 ; 1.6)	-2.5 (-5.1 ; -1.3)	-1.0 (-1.7 ; 1.7)
sRNA_2210	-1.4 (-1.9 ; -1.1)	-0.9 (-1.0 ; 1.1)	-1.3 (-1.7 ; -1.0)	-1.5 (-2.8 ; 1.3)
sRNA_2410	-1.3 (-1.5 ; -1.2)	-1.2 (-1.8 ; 1.3)	-1.3 (-3.9 ; 2.5)	-2.1 (-3.0 ; -1.5)
Late exponential				
sRNA_0030	-5.6 (-10.5 ; -3.0)	-6.7 (-7.8 ; -5.8)	1.8 (1.3 ; 2.6)	-17.3 (-22.2 ; -13.5)
sRNA_0120	-31.8 (-37.1 ; -27.3)	-43.5 (-67.8 ; -27.9)	-1.8 (-4.1 ; 1.2)	-56.7 (-80.6 ; -39.9)
sRNA_0160	-81.8 (-130.0 ; -51.5)	-55.1 (-87.1 ; -34.8)	-1.5 (-3.1 ; 1.3)	-83.3 (-118.7 ; -58.5)
sRNA_0280	-13.4 (-17.6 ; -10.2)	-24.6 (-32.1 ; -18.9)	-1.2 (-1.4 ; -1.0)	-18.2 (-33.2 ; -10.0)

sRNA_1260	-3.4 (-9.7 ; -1.2)	-4.4 (-8.5 ; -2.3)	1.8 (1.6 ; 2.0)	-5.7 (-11.3 ; -2.9)
sRNA_1300	-12.3 (-24.2 ; -6.3)	-8.0 (-11.7 ; -5.5)	2.8 (1.8 ; 4.5)	-6.2 (-9.1 ; -4.2)
sRNA_2050	-2.3 (-5.6 ; 1.1)	-4.5 (-7.3 ; -2.8)	1.8 (1.3 ; 2.3)	-9.6 (-26.9 ; -3.4)
sRNA_2210	-15.9 (-33.9 ; -7.5)	-25.7 (-33.5 ; -19.7)	1.0 (1.0 ; 1.0)	-28.6 (-37.6 ; -21.7)
sRNA_2410	-4.1 (-8.0 ; -2.1)	-4.1 (-4.7 ; -3.5)	-1.5 (-2.7 ; 1.3)	-8.8 (-15.2 ; -5.1)

Early stationary

sRNA_0030	-11.1 (-15.8 ; -7.8)	-35.5 (-36.2 ; -34.8)	-4.2 (-5.7 ; -3.1)	-69.4 (-90.7 ; -53.1)
sRNA_0120	-13.5 (-24.1 ; -7.6)	-23.6 (-50.8 ; -10.9)	-5.4 (-7.9 ; -3.7)	-145.2 (-184.2 ; -114.4)
sRNA_0160	-271.0 (-287.6 ; -255.3)	-42.1 (-50.2 ; -35.4)	-3.7 (-5.9 ; -2.4)	-45,175 (-57,158 ; -35,705)
sRNA_0280	-122.4 (-268.2 ; -55.9)	-46.6 (-61.5 ; -35.3)	-6.2 (-7.6 ; -5.0)	-1009 (-1,473 ; -690.6)
sRNA_1260	-2.1 (-4.5 ; -1.0)	-22.5 (-23.0 ; -22.0)	-5.9 (-8.0 ; -4.4)	-20.4 (-27.7 ; -15.1)
sRNA_1300	-4.9 (-9.3 ; -2.6)	-2.3 (-6.0 ; 1.1)	-2.8 (-4.6 ; -1.7)	-26.4 (-48.7 ; -14.3)
sRNA_2050	-3.8 (-5.5 ; -2.6)	-17.6 (-23.4 ; -13.3)	-5.8 (-6.9 ; -4.9)	-13.0 (-20.4 ; -8.3)
sRNA_2210	-5.6 (-8.2 ; -3.8)	-19.2 (-37.8 ; -9.8)	-7.2 (-8.9 ; -5.8)	-73.9 (-99.5 ; -54.8)
sRNA_2410	-6.2 (-13.0 ; -2.9)	-11.5 (-15.6 ; -8.5)	-5.1 (-6.7 ; -3.8)	-14.1 (-19.6 ; -10.2)

Table S2. Expression variations of 3 regulatory RNAs from *S. aureus* under biocide sub-inhibitory concentrations at three growth stages: mid-exponential, late exponential and early stationary. Significant fold differences (fold change ≤ -10 or ≥ 10) are presented in bold characters.

Regulatory sRNA	Fold difference in sRNA relative to untreated			
	Chlorhexidine	Benzalkonium chloride	PVP-iodine	Triclosan
Mid-exponential				
ARN III	-26.8 (-191.1; -3.7)	-1.3 (-1.8 ; 1.0)	2.3 (1.5 ; 3.4)	1.7 (1.1; 2.6)
SprD	-1.3 (-4.3 ; 2.4)	18.2 (9.4 ; 35.4)	14.7 (11.4 ; 18.8)	-1.8 (-3.0 ; -1.1)
SprX	1.6 (-2.0 ; 5.2)	18.6 (8.8 ; 39.2)	77.6 (48.3 ; 124.7)	1.2 (-1.3 ; 1.9)
Late exponential				
ARN III	-10.6 (-208.8; 1.9)	-6.2 (-26.8 ; -1.4)	1.9 (1.3 ; 2.9)	-1.5 (-2.3 ; -1.0)
SprD	-1.3 (-3.6 ; 2.0)	2.0 (1.0 ; 4.2)	4.1 (3.7 ; 4.6)	-5.0 (-6.0 ; -4.2)
SprX	6.7 (-1.6 ; 69.6)	57.9 (40.9 ; 81.8)	66.2 (65.0 ; 67.4)	2.3 (1.6 ; 3.2)
Early stationary				
ARN III	-1,310 (-1,365.7 ; -1,256.7)	-4.4 (-6.0 ; -3.2)	2.3 (1.2 ; 4.4)	2.4 (2.2 ; 2.5)
SprD	-1.7 (-17.9 ; 6.3)	-5.3 (-10.9 ; -2.5)	1.1 (-1.7 ; 1.9)	1.3 (1.1 ; 1.7)
SprX	2.3 (-4.3 ; 22.2)	1.6 (-1.0 ; 2.5)	4.9 (3.0 ; 7.8)	3.3 (2.9 ; 3.7)

2. Informations supplémentaires

2.1. Validité du gène de ménage *adk*

Etant donné la répression globale de tous les sARN testés chez *E. faecium* et l'importance d'avoir un calibrateur stable pour certifier la fiabilité des résultats de quantification relative, nous nous sommes assurés que le gène *adk* n'était pas soumis à des variations d'expression en présence d'antiseptiques. Pour cela, un autre gène de ménage, *clpX*, codant pour une protéase ATP-dépendante et utilisé dans d'autres travaux de RT-qPCR sur *E. faecium* a été utilisé [123]. L'absence de différence significative entre les Ct obtenus pour *adk* et *clpX* en condition témoin et CSI d'antiseptiques (chlorhexidine et chlorure de benzalkonium) a permis de valider la calibration par *adk* de nos résultats de RT-qPCR relative ($p = 0,25$; test de Wilcoxon pour la comparaison de moyennes de petits échantillons appariés).

2.2. Note supplémentaire de discussion

Les profils de croissance de *S. aureus* et de *E. faecium* semblaient en accord avec la notion de 'concentration exponent' η tel que décrit précédemment. En effet, la croissance bactérienne était directement corrélée aux dilutions du triclosan, comme indiqué par sa valeur η élevée. Pour les trois autres molécules, les dilutions entraînaient un effet moins graduel sur la croissance, cohérent avec une valeur η faible [48].

Par ailleurs, la littérature rapporte une activité maximale de la PVP-I à 0,1% (soit 1 g/L), ce qui correspond au relargage maximal de l'iode actif à partir du polymère. Au-delà et en-deçà de cette dilution, la quantité d'iode actif disponible est moindre et donc l'activité antiseptique décroît [54]. Ce paramètre de relargage à partir de la matrice polymère s'ajoute à la notion de η propre à l'iode actif et complexifie l'interprétation des résultats. Étonnamment, dans notre travail, la concentration de PVP-I à environ 1 g/L correspondait à la CSI, *i.e.* à la concentration n'ayant pas d'impact sur le profil de croissance de la souche. Bien que cela puisse paraître contradictoire, cette différence de résultats peut s'expliquer par le fait que la détermination de la CSI à environ 1 g/L a été faite par comparaison des profils de croissance après lecture automatisée des DO_{600} ,

processus différent de la numération bactérienne car il ne permet pas de distinguer les bactéries viables et mortes.

Analyses complémentaires

1. Recherche d'induction de résistance à la vancomycine

La résistance à la vancomycine médiée par le gène *vanB* étant inductible, nous avons souhaité évaluer si une pression antiseptique par chlorhexidine pouvait être un stimulus. Pour cela, l'expression du gène *vanB* en présence de CSI de chlorhexidine a été quantifiée par RT-qPCR relative en 2 étapes comme décrit précédemment et sur les mêmes extraits d'ARN totaux que ceux réalisés pour l'étude des sARN. La comparaison entre les niveaux d'expression de *vanB* en présence et en absence de CSI de chlorhexidine a permis de montrer une répression significative de *vanB*, principalement en phase LE (fold change = -18) puis une tendance à la normalisation en phase ES (fold change = - 4,6). En 2016, une étude transcriptomique globale par RNA-seq et RT-qPCR sur des souches de *E. faecium* et *E. faecalis* exposées à de la chlorhexidine avait fait état d'une induction de *vanA* et de l'absence d'impact sur *vanB* [123]. La discordance avec nos résultats peut être en partie expliquée par différents biais méthodologiques. En effet, l'équipe de Bhardwaj *et al.* [123] a utilisé une formulation commerciale de chlorhexidine (Hibiclens : chlorhexidine 4% + alcool isopropylique) pour une concentration finale fixée à 4,9 mg/L sur la souche *E. faecium* TUH4-64 exposée à l'antiseptique pendant 15 minutes. Dans notre travail, il s'agissait de chlorhexidine digluconate seule, utilisée à la concentration de 0,5 mg/L sur la souche *E. faecium* Aus0004 exposée pendant 5 h de croissance.

Avec ces deux études, nous pouvons malgré tout constater que les opérons *vanA* et *vanB* semblent répondre différemment à la présence de chlorhexidine.

2. Analyse transcriptomique globale par RNA-seq

Comme évoqué à la fin de l'axe n°1, l'étude sur *S. aureus* n'a pas été poursuivie dans les suites de cette thèse afin de concentrer les efforts sur *E. faecium* et notamment l'Ern0160. Sur cette espèce, nous avons tenu à « dézoomer » notre point de vue sur la question de l'impact des antiseptiques à faibles concentrations en réalisant une analyse transcriptomique globale par RNA-seq avec et sans stress antiseptique. Les résultats de RT-qPCR montraient d'importantes variations des sARN en présence de chlorhexidine digluconate, chlorure de benzalkonium et triclosan. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier en RNA-seq les stress de chlorhexidine et de chlorure de benzalkonium en raison de leur usage en médecine humaine à l'hôpital et en communautaire.

2.1. Matériels et méthodes

2.1.1. Echantillons testés, conditions de culture et extraction des ARN

La souche *E. faecium* Aus0004 a été cultivée à 37°C en milieu BHI. La vérification des CSI déterminées auparavant par lecture automatique des DO₆₀₀ (Synergy 2 Multi-Mode Reader BioTek) a été effectuée par lecture manuelle des DO₆₀₀ toutes les heures pendant 6h et dans un volume de culture identique à celui qui serait utilisé pour l'obtention des extraits pour RNA-seq soit 30 mL. Les concentrations testées ont été 0,25 et 0,5 mg/L pour la chlorhexidine digluconate et 1,0 et 2,0 mg/L pour le chlorure de benzalkonium. La CSI de la chlorhexidine a été confirmée à 0,5 mg/L dans ces nouvelles conditions mais la CSI du chlorure de benzalkonium a été déterminée une demi-dilution plus faible qu'en microplaque, soit à 1 mg/L au lieu de 2 mg/L. Les culots bactériens ont été récoltés en fin de croissance exponentielle (LE) à 3h30 de culture (DO₆₀₀ ≈ 2,0) et les ARN totaux ont été extraits par précipitation phénol/chloroforme et éthanol. L'ADN chromosomique résiduel a été éliminé par traitement DNase (Turbo DNA-free kit, Invitrogen). L'intégrité, les concentrations et la pureté des ARN totaux ont été vérifiées par Bioanalyzer (Agilent). Les échantillons qui

présentaient un 'RNA integrity number' (RIN) < 9 n'ont pas été retenus. Pour chaque condition, des duplicats biologiques indépendants ont été réalisés.

2.1.2. Librairies, séquençage et analyse statistique

L'analyse RNA-seq a été sous-traitée à la plateforme ViroScan3D (Lyon, France). La préparation des librairies a été effectuée à l'aide du kit Ovation Universal Prokaryotic RNA-Seq (Nugen) avec une déplétion personnalisée (Anydeplete rRNA design *Enterococcus faecium*). Les échantillons ont été séquencés en Illumina NextSeq 500 (protocole multiplex, 1 × 75 pb). Pour l'analyse bio-informatique, les séquences ont été alignées sur le génome d'*E. faecium* Aus0004 et comptées à l'aide du logiciel CLC Genomics Workbench v10.0.1 (CLCbio, Qiagen, San Diego, CA, USA). L'analyse statistique a également été réalisée à l'aide de CLC Genomics Workbench. A partir des données brutes, les critères RPKM ≥ 10 et fold change $\geq |2|$ (p-value ajustée $\leq 0,05$, Edge-test FDR correction) entre condition avec et sans antiseptique ont été appliqués pour la discrimination de gènes cibles d'intérêt.

2.2. Résultats et discussion

2.2.1. Qualité des données RNA-seq

Les performances de séquençage sont résumées dans l'Annexe 3. La déplétion ribosomique a été satisfaisante (> 90%) pour tous les échantillons. Environ 15-30 millions de 'reads' ont été obtenus pour chaque librairie d'ADNc avec 84-91% des 'reads' alignés sur le génome de référence. La reproductibilité entre les duplicats était satisfaisante pour la condition contrôle ($R^2 > 0,93$) et pour la condition chlorhexidine 0,5 mg/L ($R^2 > 0,91$). En condition chlorure de benzalkonium, la dispersion des 'reads' était plus importante conduisant à une moins bonne reproductibilité inter-duplicats ($R^2 = 0,82$) (Annexe 4).

2.2.2. Effet des CSI d'antiseptique sur les sARN

De façon inattendue, la répression globale de l'expression des sARN observée par RT-qPCR n'a pas été retrouvée en RNA-seq ni en présence de chlorhexidine ni de chlorure de benzalkonium. Afin d'essayer de comprendre ces résultats non attendus, les extraits d'ARN totaux utilisés pour le RNA-seq ont été repris pour analyse en RT-qPCR relative en une étape avec le kit Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step, ThermoFisher Scientific. Les niveaux d'expression des gènes *ern0120* et *ern0160* ont été étudiés car ils présentaient les variations les plus importantes en phase LE lors des premiers essais (respectivement -32 et -82 en condition CH et -43 et -55 en condition BC) [124]. Là encore, aucune variation significative n'a été retrouvée dans les niveaux d'expression des sARN laissant penser à une anomalie avec les solutions antiseptiques utilisées pour le RNA-seq. En l'absence de méthode disponible, le dosage des composés n'a pas été réalisé. Dans l'éventualité d'une erreur lors de la préparation des solutions antiseptiques, ces dernières ont été décongelées et utilisées pour la réalisation de CMI sur la base des protocoles mis au point dans l'axe n°1. Aucune différence significative n'a été trouvée par rapport aux CMI déterminées précédemment. L'hypothèse d'une dégradation des molécules de chlorhexidine et de chlorure de benzalkonium en composés conservant une activité antimicrobienne pourrait expliquer le maintien des valeurs de CMI et l'absence d'impact sur l'expression des sARN mais reste toutefois peu convaincante.

2.2.3. Autres impacts

Outre les résultats décevants sur les sARN et l'absence d'explication sur cette discordance, nous avons tout de même analysé les données RNA-seq afin d'évaluer les variations transcriptomiques (en présence d'antiseptique ou de leur produit de dégradation). Les résultats obtenus pour la condition CH sont présentés en Annexe 5 et Annexe 6. Au total, 30 gènes étaient surexprimés, principalement dans des fonctions de biosynthèse de nucléotides, de transport de molécules ainsi que des protéines ribosomales. A l'inverse, 58 gènes étaient réprimés, occupant des fonctions variées dans la physiologie cellulaire. Dans la condition BC,

seuls 2 gènes ont montré des variations significatives selon les critères définis précédemment (RPKM ≥ 10 , fold change $\geq |2|$, p-value ajustée $\leq 0,05$). Ces gènes, nommés EFAU004_02580 et EFAU004_02581 étaient fortement induits (fold changes de +53 et +58, respectivement ; $p < 10^{-7}$). En présence de CH, EFAU004_02581 était également significativement augmentée (fold change de +4,2 ; $p = 0,046$) tandis que l'augmentation de l'expression de EFAU004_02580 était proche de la significativité (fold change +3,5 ; $p = 0,058$). Aucun gène environnant ne présentait de variation d'expression en condition CH ou BC. Les 2 gènes d'intérêt ont été trouvés comme organisés en opéron bicistronique sur le brin + (Figure 12) et codant pour des pompes d'efflux de types transporteurs ABC. Devant le recoupement de ces résultats pour les 2 conditions, la recherche du rôle de ces gènes codant dans la gestion du stress antiseptique a été poursuivie.

3. Rôle de transporteurs ABC dans la réponse au stress antiseptique

3.1. Matériels et méthodes

L'environnement génétique, la recherche d'homologues et les structures protéiques prédites ont été obtenus à l'aide des données Genbank et des logiciels BLAST, CLUSTALW et TMHMM [125]. Pour évaluer l'implication de ces gènes dans la réponse à un stress antiseptique, la souche Aus0004 a été mise en culture en milieu BHI avec des concentrations croissantes de 0,5 mg/L à 4 mg/L de chlorhexidine digluconate ou de chlorure de benzalkonium. Comme précédemment, les culots bactériens ont été récoltés aux phases ME, LE et ES et les ARN totaux ont été extraits par phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol et analysés en RT-qPCR absolue en une étape. Les amorces utilisées sont présentées en Annexe 1. La comparaison des niveaux d'expression entre témoin et chaque concentration d'antiseptique à chaque temps de croissance a été analysée par 1-way ANOVA, test Tukey au moyen du logiciel GraphPad Prism. Afin d'aller plus loin, nous avons souhaité étudier l'impact de la délétion de ces gènes pour une souche soumise aux mêmes stress. En raison de leur proximité (14 nucléotides), une délétion conjointe des 2 gènes a été décidée par technique de

recombinaison homologue avec le plasmide thermosensible pWS3 comme précédemment décrit [126]. Les amorces utilisées sont présentées en Annexe 1.

3.2. Résultats et discussion

3.2.1. Environnement génétique et analyse des séquences protéiques

L'analyse BLAST a montré que EFAU004_02580 et EFAU004_02581 étaient retrouvés chez de nombreuses souches de *E. faecium*, et présentaient respectivement un maximum de 67% et 78% d'homologie avec des gènes de *E. faecalis*. A noter, une correspondance à 100% d'homologie a été trouvée pour les deux gènes avec une souche d'*Enterococcus hirae* (GenBank: VTQ87655.1 et VTQ87663.1 respectivement). Aucun homologue n'a été trouvé chez *S. aureus*. L'analyse *in silico* des séquences protéiques a permis la reconnaissance des trois motifs caractéristiques de la cassette de fixation de l'ATP : Walker A, Walker B et la signature spécifique des transporteurs ABC ainsi que des 6 domaines transmembranaires (Figure 13).

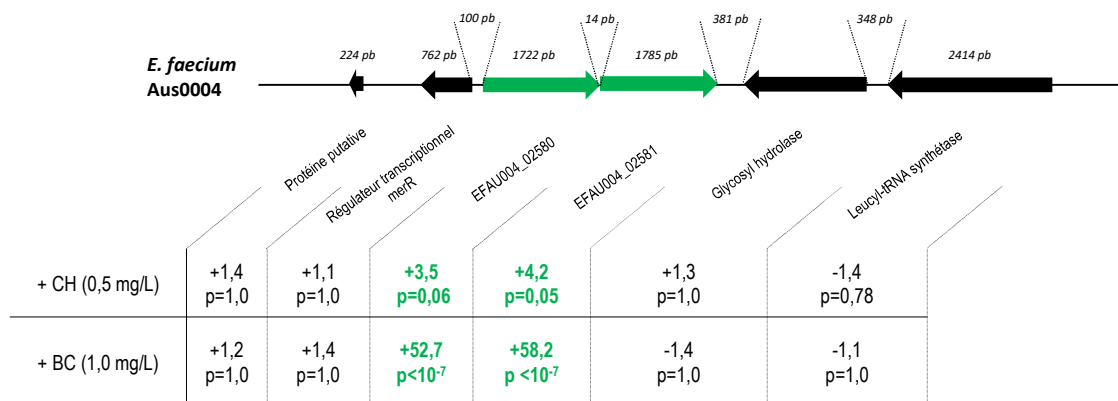


Figure 12 : Environnement génétique des gènes d'intérêt EFAU004_02580 et EFAU004_02581.

Les différences d'expression des gènes pour les conditions chlorhexidine (+CH) et chlorure de benzalkonium (+BC) par rapport au contrôle sans antiseptique sont issues des données RNA-seq.

2580	-----MSILKTFLOKNKGLALL---TFVMICLQIAGTLGVPKLVAKLID	41
2581	MEKKKTLNTRALIRFWKMIKPEHKYFGLFLCSLFGNLLVVAMP  LIMGIGIDDLSEIRK	60
	..:* : ** * : :* .*:... :	
	TGIASGEASVIKKIGVE-MLLV---AFLGTIAAVASSYFSALASARFGFQTRKEYFRKFQ	97
	TGIGQLSFSDIKQALLFPVLLLLIGCSVLSSITSFIQERTMAALSEKITLVRKEITKKFK	120
	.. . * ** : : : : .*:...:.. * * : : :*: : ***:	
	QLSMKDISRFSSGSLLRMTNDVDNVQQMIVLFCQMILPAPVICVFTILMMFRYSLLLTW	157
	TLPMSFFDNHQVGDIIISRTTGLNQLSQQVLLTGINQFFTSVVTIAAAGLMLFYIESKLTTL	180
	* * * . : : * * . : : : * . : : * : * . * * . * * . * *	
2580	VTLISVVFYVWIVYRLMKRGAPLSLSIQPKMDRITITLREFFTGINMIRAFDNQSYEEKR	217
2581	LVLLLIIVGSSIVTKIANKNKQISEQNQYELGLVNNRMEELAGNLVVKTFNQQAHAEEA	240
	..* : * : . : : : . * . * . * : . * : : * : : * : : * : :	
	TN---KSFADYANQMI---KVNRIFAVVTPIAFLLMGIVYASILWFGGNLVAEGALQIG	270
	IHEVNNKQYNAFKRAQFMNFAIYPAIRFINQLAF-----IISAVFGAMLVLSGGVTTIG	293
	: * . : . . : : : : : * : : : : * * . * * . * . : * *	
	VVTAVVEYSMLTLAYLMIAAMVLVIIPKSFASLRRIEELQAEIEIEEETIKTVAEPTFD	330
	FLQAYLQYINQISEPISTASYVINSIQSAMAADRIFEILDETDEIPDLPDARL---LEQ	350
	.. * : : * : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	<i>Walker A</i>	
2580	QTNAAAFVHTVFKYTEISDPVLEDIDFTIPKGGTAAIV  GGTGS	390
2581	PKGKIAFNQVQFYGYS-DKILMNQVDFSVKPKQTVAV  GPTGAGKTTLVNLMLRFYELNK	409
	.. * : : * * * . . . : : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	<i>Q loop</i>	
	GKVTLGGIPLTQMTQEQRSHISYVVP  QKAF	450
	GKIEFDGLDITKLSRGEIARRSFGMVL  QNTWLFEGTVADNIAYGKMDATREQIEAAEIAQ	469
	** : . * : : * : : : * : . . * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	<i>ABC signature</i> <i>Walker B</i> <i>D loop</i>	
	LEELVDLTPDGLDSFVAQGSNY  SGGQKQ	510
	CDHFIRTLPDGYDTIISSENGT  LSQGGQQLLT	529
	.. : : * * * * * * : : : . . . * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	<i>H loop</i>	
2580	LRAALHKHMSEKTLVIVAQRLSTIQQADNIIVLDEGKIVGQGTHEELLSNCQTYQEFKAS	570
2581	IQQAMEAVTKDRTSFVIA  HRLSTIENADMILVMKNGDIVEKGTHSELLQSPTLYASLYNS	589
	.. * . . . : * . . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	QGI-- 573	
	QFQIA 594	
	*	

Figure 13 : Alignement par Clustal 0 (1.2.4) des séquences protéiques pour les transporteurs ABC.

Les domaines caractéristiques Walker A, Walker B et la signature ABC sont mis en évidence en rouge, bleu et vert respectivement. Les zones surlignées grises correspondent aux prédictions des domaines transmembranaires. Les autres motifs conservés typiques des transporteurs ABC (Q, D et H) apparaissent en violet.

3.2.2. Expression en gradient antiseptique

L'extraction d'ARN a pu être réalisée pour toutes les conditions prévues sauf pour la chlorhexidine à 4 mg/L en raison d'une absence de croissance de la souche à cette concentration, conformément à ce qui avait été trouvé précédemment (cf article n°1). L'analyse par RT-qPCR de la condition chlorure de benzalkonium à 4 mg/L n'a pas pu être interprétée en raison d'une variabilité majeure entre les duplicats biologiques, pouvant être liée à une dégradation des ARN. Les résultats de l'expression de EFAU004_02580 en présence du

gradient de concentration de chlorhexidine et de chlorure de benzalkonium de 0,5 mg/L à 2,0 mg/L sont présentées dans la Figure 14. En l'absence d'antiseptique, l'expression de EFAU004_02580 diminuait au fur et à mesure de la croissance bactérienne et n'était quasiment plus exprimée en phase stationnaire. Son expression était significativement augmentée en présence de chlorhexidine et de chlorure de benzalkonium conformément aux résultats de RNA-seq. L'étude de l'expression en présence d'un gradient antiseptique a donné des résultats intéressants. L'effet du stress antiseptique était globalement inducteur de l'expression du gène EFAU004_02580, mais les modifications ne suivaient pas les mêmes cinétiques en fonction de la concentration considérée. En effet, pour la chlorhexidine, l'effet inducteur concentration-dépendant était présent aux phases ME et ES mais à la phase LE, c'est la concentration à 1 mg/L (soit $2 \times$ CSI) qui entraînait la plus grande variation. A cette même phase et à la concentration de 0,5 mg/L, la variation d'expression n'était pas significative, et rejoignait les résultats du RNA-seq réalisé dans les mêmes conditions expérimentales (phase LE, CH à 0,5 mg/L). Pour le chlorure de benzalkonium, l'effet inducteur était maximal en phase LE pour les concentrations à 0,5 mg/L et 2 mg/L alors que pour la CSI (1 mg/L), l'effet inducteur était majeur lors de la phase exponentielle de croissance. Contrairement au RNA-seq, aucune induction significative n'a été retrouvée aux mêmes conditions expérimentales (phase LE, BC à 1 mg/L). L'analyse pour le gène EFAU004_02581 est en cours.

Le processus de délétion conjointe des 2 gènes n'a pas abouti. En effet, malgré une intégration efficace de la construction plasmidique pWS3 Ω EFAU004_02580-81 au niveau chromosomique, aucune excision n'a été obtenue en dépit de nombreux essais. L'échec de l'obtention de mutants délétés est probablement dû au rôle essentiel de ces transporteurs ABC dans l'homéostasie cellulaire de *E. faecium* Aus0004 comme pour tous les transporteurs de cette famille [127]. En effet, les transporteurs ABC sont impliqués dans la translocation d'une grande variété de substrats allant des ions, des sucres, des acides aminés, des vitamines, des lipides ainsi que des molécules plus volumineuses tels que des protéines de haut poids moléculaire et participent

ainsi à des processus cruciaux du cycle cellulaire comme l'absorption de nutriments, le trafic de lipides et également l'excrétion de médicaments et d'antibiotiques. En l'absence de délétion possible, une alternative pour l'étude de la fonction de ces gènes dans la gestion du stress antiseptique pourra être leur surexpression avec le vecteur pAT29 afin de mettre en évidence un éventuel phénotype de sensibilité diminuée ou de tolérance. Par ailleurs, un inhibiteur de pompe d'efflux pourrait être utilisé telle que la réserpine comme décrit chez *Bacillus subtilis* si elle est substrat de ces pompes [128].

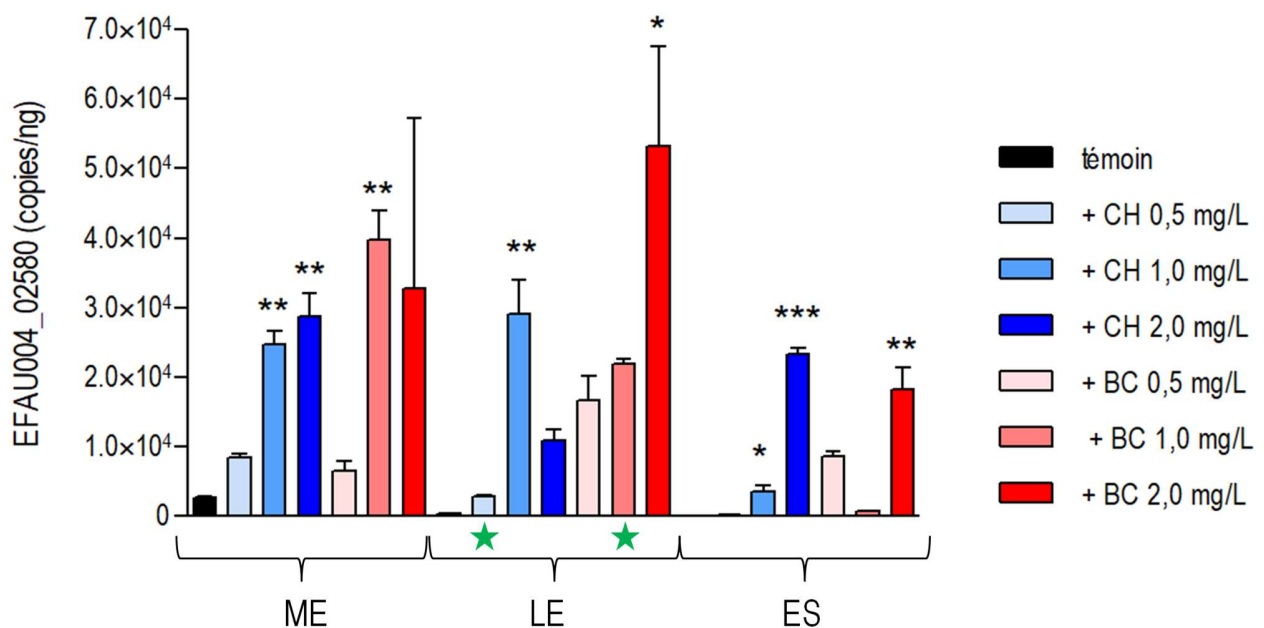


Figure 14 : Expression de EFAU004_02580 sans (en noir) et avec des concentrations croissantes de chlorhexidine digluconate (en bleu) et de chlorure de benzalkonium (en rouge).

Les étoiles vertes correspondent aux conditions expérimentales du RNA-seq. ME : milieu de phase exponentielle ; LE : fin de phase exponentielle ; ES : début de phase stationnaire ; * : p-value < 0,05 ; ** : p-value < 0,005 ; * : p-value < 0,0001.

AXE N°3 ÉTUDE DE l'Ern0160

Contexte

Comme décrit précédemment, en 2017, 61 sARN ont été identifiés chez *E. faecium* et 10 ont été validés expérimentalement [110]. Parmi eux, l'Ern0160 est apparu conservé chez toutes les souches d'*E. faecium* étudiées, quel que soit le clade considéré. Dans cette même étude, les auteurs ont montré que l'expression d'*ern0160* était significativement diminuée en présence de CSI de daptomycine. En outre, sur la base de l'annotation de ces sARN, la réinterprétation des données de RNA-seq issues d'une analyse antérieure en présence de CSI de ciprofloxacine [129] a mis en évidence une répression de *ern0160* dans ces nouvelles conditions (-9,89, p-value Bonferoni 10^{-6}) après analyse bio-informatique réalisée par le Dr. Killian Le Neindre dans le cadre de sa thèse de Doctorat [112]. Au cours de l'axe n°2 de la présente thèse, nous avons montré que l'expression de *ern0160* était significativement diminuée en présence de certains biocides [124]. Enfin, l'Ern0160 a été décrit comme conférant un avantage potentiel lors de la colonisation intestinale sur modèle murin [118]. L'ensemble de ces éléments nous a amené à caractériser plus avant ce sARN d'intérêt.

Matériels et méthodes

1. Souches

Afin de poursuivre l'étude du rôle de l'Ern0160 dans la réponse au stress antimicrobien chez *E. faecium*, la souche native Aus0004 et les 3 mutants isogéniques ont été utilisées pour la suite des essais. Comme précisé dans l'axe n°1, la construction de ces souches a fait l'objet d'un travail de Master 2 et d'une thèse de doctorat en réalisé au laboratoire par le Dr. Killian Le Neindre [112]. Une partie de ces résultats a été valorisée par publication scientifique en cours de soumission.

2. Recherche de variations phénotypiques

2.1. Profils de croissance

Les profils de croissance des 4 souches ont été déterminées par lecture manuelle de l'absorbance (DO_{600}) et comparés à ceux obtenus lors du travail de thèse du Dr. Reissier réalisé au sein du laboratoire [113].

2.2. Ern0160 et antibiotiques

En plus des conditions antiseptiques, l'impact de la présence/absence/surexpression de *ern0160* a été étudié par la réalisation des CMI d'antibiotiques d'usage courant pour le traitement des infections à *E. faecium* (vancomycine, téicoplanine et daptomycine). Le screening de molécules a également inclus des fluoroquinolones (ciprofloxacine et lévofloxacine), antibiotiques d'usage courant pour le traitement d'autres types d'infections et auxquelles les entérocoques sont exposés au sein du microbiote digestif.

3. Recherche de cibles

3.1. Prédiction *in silico* sans a priori

Cette partie est détaillée dans l'article n°2 en cours de soumission. Brièvement, les logiciels TargetRNA2 et IntaRNA ont permis la prédiction de nombreuses cibles parmi lesquelles 4 ont été sélectionnées pour leur probabilité d'interaction et/ou leur fonctions biologiques pertinentes : 2 gènes homologues codant pour des protéines à domaine LysM (EFAU004_01059 et EFAU004_01150), 1 gène prédit par les 2 logiciels et codant pour un transporteur ABC (EFAU004_00722) et le gène *ddcP* (EFAU004_01934) impliqué dans la synthèse des précurseurs du peptidoglycane, composant principal de la paroi des bactéries à Gram positif.

3.2. Etude transcriptomique

3.2.1. RNA-seq

Le RNA-seq évoqué dans l'axe n°2 a également inclus l'analyse des 4 souches d'*E. faecium* afin d'identifier les gènes dont l'expression était modifiée avec l'absence et la surexpression *ern0160*. Les conditions de culture de la souche délétée ont été identiques à celles de la souche native et celles des souches complémentées comprenaient une supplémentation en spectinomycine à 300 mg/L. En dehors de cela, les modalités de réalisation étaient identiques à celles détaillées dans l'axe n°2 et ne seront pas répétées ici pour éviter les redondances de lecture.

3.2.2. RT-qPCR

L'analyse de l'expression des cibles prédites *in silico* est détaillée dans l'article n°2. En plus de ces cibles, d'autres gènes ont été inclus en raison de résultats issus de l'étude des variations phénotypiques ou du RNA-seq. Les amorces utilisées pour ces analyses complémentaires sont présentées en Annexe 1. Pour ces analyses, les modalités de culture et de récolte des extraits d'ARN ont été identiques à celles déjà décrites et la RT-qPCR a été réalisée en une étape avec le kit Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step (ThermoFisher Scientific).

4. Validation expérimentale des cibles directes

4.1. Retard sur gel

Les modalités de réalisation sont présentées dans l'article n°2. La matrice ADN nécessaire à la production des transcrits était de l'ADN génomique d'Aus0004 obtenu avec le kit InstaGene™ Matrix, Bio-Rad. La transcription *in vitro* a été faite avec le kit MEGAscript T7 kit (Ambion) et les ARN obtenus étaient ensuite traités à la DNase et précipités à l'éthanol. Les amorces de cibles testées non présentées dans l'article n°2 sont présentées en Annexe 1.

Le marquage radioactif de l'Ern0160 a été réalisé de 2 manières. Dans un premier temps, par substitution en 5' de l'ATP par une molécule [γ^{32} -P]-ATP (Amersham Biosciences) au moyen de T4 polynucleotide kinase (Invitrogen). Ensuite, afin d'essayer d'améliorer la sensibilité et la résolution des images obtenues pour les cibles retenues, le marquage radioactif a été fait en même temps que la transcription *in vitro* avec incorporation de [α^{32} -P]-UTP au fur et à mesure de la synthèse. De nombreux essais ont été nécessaires afin d'optimiser la migration et la révélation, principalement pour les complexes dont la taille était de l'ordre de 1000 pb.

4.2. Système rapporteur à double plasmide

Cette méthode, décrite initialement chez les bactéries à Gram négatif a été adaptée chez les bactéries à Gram positif (*S. aureus*, *Listeria monocytogenes* et *B. subtilis*) au sein du laboratoire [106, 130]. Dans

ces systèmes, l'interaction du sARN avec son ARN cible est étudiée après co-transformation dans une même souche d'un plasmide portant le gène de sARN et d'un autre portant le gène cible, fusionné à un gène rapporteur (Figure 15). Classiquement le gène de la GFP est utilisé comme rapporteur. L'intensité de fluorescence est corrélée à l'expression de la fusion gène cible-*gfp* et son suivi permet d'évaluer la régulation effectuée par le sARN sur le niveau d'expression de sa cible. Ce système n'ayant pas été testé sur l'espèce *E. faecium*, nous avons convenu d'effectuer les essais en système hétérologue chez *S. aureus* puis de tester chez *E. faecium*.

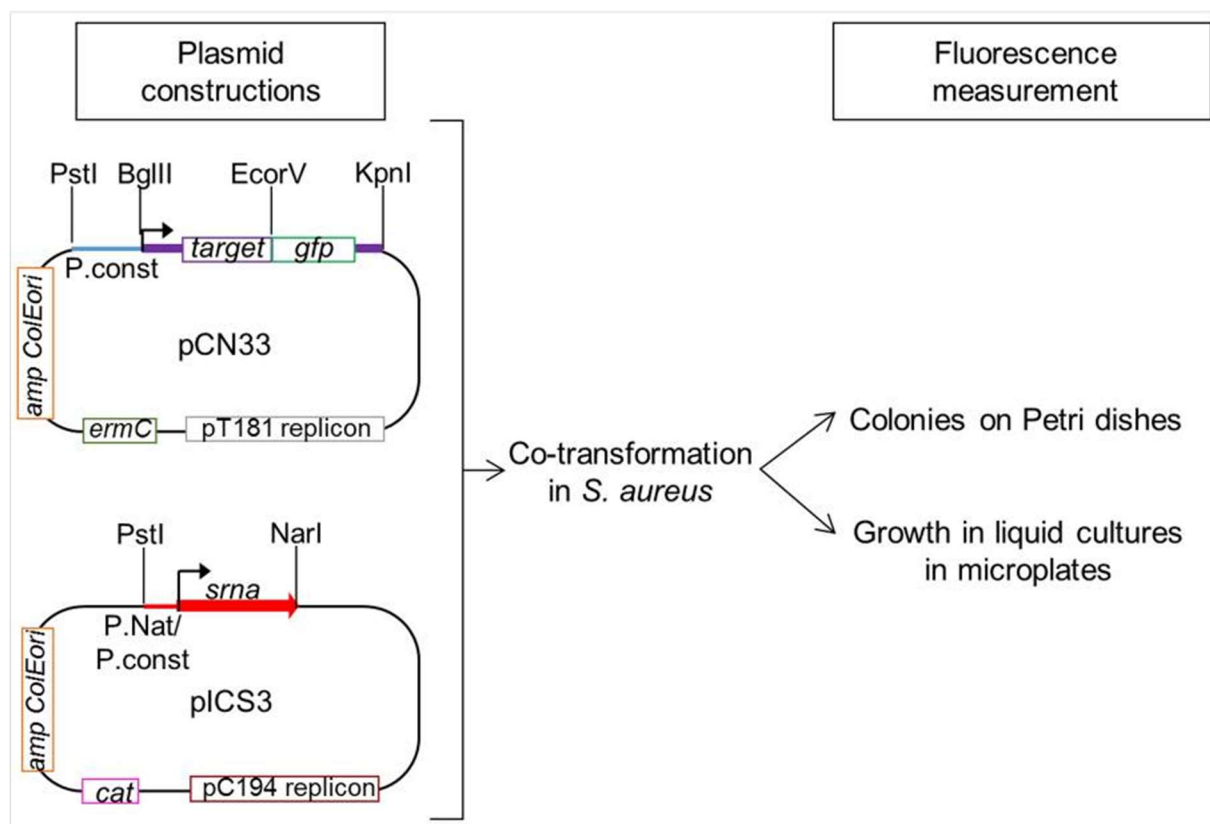


Figure 15 : Principe de l'étude *in vivo* par le système à double plasmide avec gène rapporteur, issu de Ivain *et al.* (106).

4.2.1. Constructions plasmidiques et clonages

Le gène *erm0160* était exprimé sous le contrôle du promoteur constitutif *PamiA* et cloné dans le plasmide pICS3 (vecteur à haut nombre de copies contenant le gène *cat* de résistance au chloramphénicol). Les gènes cibles étaient exprimés sous le contrôle du promoteur constitutif *PtufA* et clonés dans le plasmide

pCN33 (vecteur à faible nombre de copies contenant le gène *ermC* qui confère la résistance à l'érythromycine) (Figure 15). Les amplicons nécessaires à ces constructions ont été obtenus par PCR à partir de l'ADN génomique d'*E. faecium* Aus0004 (InstaGene™ Matrix, Bio-Rad Laboratories) avec des amorces contenant les séquences des promoteurs constitutifs ainsi que des séquences flottantes homologues des plasmides nécessaires pour les expériences de clonage ultérieures (Gibson Assembly Master Mix, New England Biolabs) (Annexe 1). Toutes les réactions de clonage ont été effectuées par choc thermique à 42°C dans *E. coli* DH5- α . Les plasmides ont été purifiés (Miniprep, Qiagen) et vérifiés par séquençage Sanger (BigDye Terminator v3.1, séquenceur ABI Prism 3130xl). Les plasmides valides ont été transformés dans la souche *S. aureus* RN4220 par électroporation (2,5 kV). La fluorescence des souches de RN4220 exprimant la fusion traductionnelle avec la GFP était mesurée au cours de la croissance bactérienne en microplaque par BioTek dans le domaine du visible (DO₆₀₀) et dans la zone de fluorescence de la GFP (DO_{485/20} et DO_{528/20}).

4.2.2. Préparation des phages pour transduction

Pour préparer le phage 80 α contenant le plasmide pICS3 avec *em0160*, une préculture de *S. aureus* RN4420 préalablement transformée avec ce plasmide a été effectuée en BHI supplémenté en chloramphénicol (10 mg/L) à 37°C avec agitation. Le lendemain, 200 μ L de cette culture ont été dilués dans 500 μ L de BHI additionné de CaCl₂ (concentration finale à 10 mM) et 100 μ L de cette dilution ont été mélangés avec 100 μ L de phage 80 α et incubés pendant 2 heures à température ambiante. Un témoin négatif sans phage 80 α a été utilisé pour visualiser la lyse bactérienne. Les phages contenant le plasmide pICS3-*em0160* ont ensuite été collectés à travers un filtre de 0,45 μ m en vue d'une transduction sur les souches de *S. aureus* RN4220 préalablement transformées avec le pCN33 portant les cibles.

Résultats et discussion

1. Ern0160 avec et sans stress antimicrobiens

La souche délétée de Ern0160 présentait un profil de croissance similaire à celui de la souche native. Pour les souches de complémentation, les profils de courbes étaient superposables entre elles mais présentaient un décalage des phases de croissance d'environ 1 heure par rapport au couple de souche native/délétée, probablement lié à la présence du plasmide pAT29 au sein de ces souches et/ou à la présence sélective de spectinomycine à 300 mg/L dans le milieu de culture. (Figure 16). Les culots bactériens pour extraction en vue de l'analyse RNA-seq et des RT-qPCR ont été obtenus aux phases de croissance déterminées dans ces essais, soit ME à 2h15, LE à 3h30 et ES à 4h45 pour les souches Aus0004 et Aus0004 Δ ern0160 et ME à 3h15, LE à 4h30 et ES à 5h45 pour les souches Aus0004 Δ ern0160_pAT29 et Aus0004 Δ ern0160_pAT29 Ω ern0160. L'impact du stress antiseptique en fonction de l'Ern0160 a été détaillé dans les axes n°1 et 2. Pour rappel, aucune variation phénotypique n'avait été mise en évidence pour les souches testées sur les essais de CMI et CSI ainsi que vitesse de bactéricidie de la chlorhexidine.

Les résultats obtenus pour les antibiotiques sont présentés dans l'article n°2.

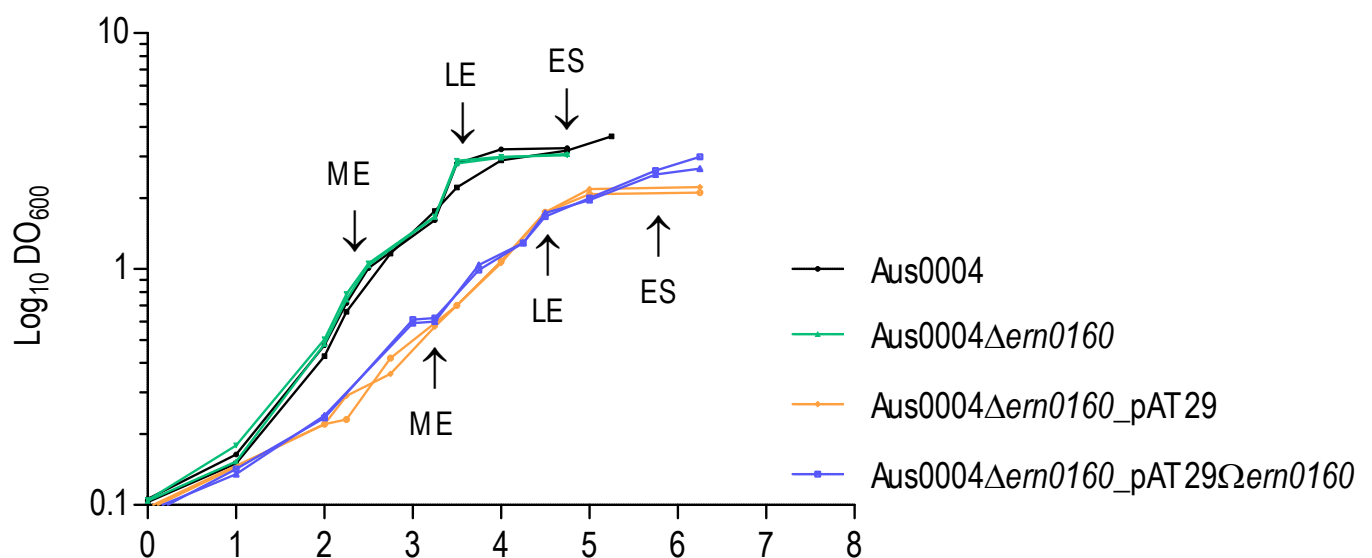


Figure 16 : Courbes de croissance des duplicats analysés en RNA-seq pour les 4 souches d'*E. faecium*, obtenues après lecture manuelle des DO₆₀₀.

2. Présentation de l'article n°2

En cours de soumission dans *Frontiers in Microbiology*.

Les résultats présentés dans cet article ont fait l'objet d'une communication affichée au congrès nationale de la SFM en 2022 (Annexe 7).

1 **The regulatory RNA Ern0160 regulates pathogenicity and fluoroquinolone resistance of**
2 ***Enterococcus faecium***

3 Running title: first description of biological functions of sRNA Ern0160

4 Loren DEJOIES^{1,2}, Valérie BORDEAU², Killian LE NEINDRE^{1,2}, Sophie REISSIER², Brice
5 FELDEN^{2†}, Svetlana CHABELSKAYA², Vincent CATTOIR^{1,2,3*}

6

7 ¹*Rennes University Hospital, Department of Clinical Microbiology, Rennes, France.*

8 ²*University of Rennes 1, Inserm UMR_S 1230, Bacterial RNAs and Medicine, Rennes, France.*

9 ³*National Reference Center for Antimicrobial Resistance (Lab Enterococci), Rennes, France.*

10

11 ***Correspondance**: Prof. Vincent CATTOIR, CHU de Rennes, Service de Bactériologie-
12 Hygiène hospitalière, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes Cedex, France. +33-2-99-28-98-
13 28, email: vincent.cattoir@chu-rennes.fr

14 †Deceased

15 Keywords: enterococci; *E. faecium*; sRNA ; virulence; fluoroquinolone ; resistance ;
16 pathogenicity

17

18 Word count: Title: 13 words; Synopsis: 265 words; Text: 2807 words; 2 Tables; 3 Figures; 36
19 References; 2 Supplemental materials.

20

21 Abstract

22 *Enterococcus faecium* is a normal inhabitant of the human gut microbiota that can turn to a
23 major opportunistic pathogen, mostly in immunocompromised patients. Regulatory RNAs
24 could have a major role in transition from commensal to pathogen as they allow rapid adaptation
25 of bacteria to their environment. Few information is known about regulatory RNAs in *E.*
26 *faecium* and Ern0160 has been so far the most studied as its implication was reported in
27 response to antibiotics (daptomycin) or biocides (chlorhexidine, benzalkonium chloride and
28 triclosan) and in intestinal colonization in a mouse model. We aimed to further characterize
29 Ern0160 functions. *In silico* predictions provided putative targets of Ern0160 of which two
30 homologous genes coding for LysM-containing domain proteins (EFAU004_01059 and
31 EFAU004_01150) were found to specifically bind to Ern0160. In addition, we found that
32 *ern0160* overexpression was responsible for repression of the target genes. As recent study
33 provided the role of these genes in virulence of *E. faecium* Aus0004 in a systemic and urinary
34 tract infections mouse model, we proposed that Ern0160 could be part of the regulatory network
35 involved during colonization/infection by attenuating virulence. Furthermore, *in vitro* tests of
36 antibiotic susceptibility profiles to vancomycin, teicoplanin, daptomycin, ciprofloxacin and
37 levofloxacin showed that strains expressing *ern0160* at normal and increased levels presented
38 repetitively lower MICs of fluoroquinolones than *ern0160*-deleted strains. No direct binding
39 was assessed but a repressive effect of Ern0160 was found on the expression of a gene
40 implicated in fluoroquinolone resistance in *E. faecium* (Efmqnr). Further *in vivo* investigations
41 are needed to delve into the bifunctional sRNA Ern0160 that regulates both virulence and
42 fluoroquinolone resistance in *E. faecium*.

43

44

45 Introduction

46 *Enterococcus* spp. are commensal bacteria of the human gastrointestinal tract, which represent
47 less than 1% of the gut microbiota of a healthy adult (1). Although they are commonly
48 considered as harmless bacteria, enterococci can turn to opportunistic pathogens and are
49 nowadays ranking among the first-rate clinical problems over the past decades. Indeed,
50 *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are currently a leading cause of hospital-
51 acquired infections worldwide (e.g. urinary tract and intra-abdominal infections, bacteremia,
52 endocarditis), especially in patients who are immunocompromised and/or hospitalized in
53 critical care units and with long-course antimicrobial treatments (2,3). *E. faecium* is currently
54 responsible for 15-25% of enterococcal infections and there is a growing concern as it is usually
55 much more resistant to antimicrobials, including penicillins, aminoglycosides (high-level
56 resistance) and glycopeptides (vancomycin-resistant enterococci [VRE]), thus limiting
57 antimicrobial therapeutic options (4). Recent WGS-based studies have highlighted two well-
58 differentiated lineages composing the *E. faecium* population: the hospital-associated (HA)
59 lineage (clade A) and the community-associated (CA) lineage (clade B) (5). Noteworthy, it
60 appears that HA *E. faecium* present higher diversity in accessory genome than CA *E. faecium*
61 that may account for their survival capabilities in hostile antimicrobial-rich environments like
62 hospital settings (5). Altogether, these characteristics allow *E. faecium* to reach the top of
63 critical pathogens. The virulence repertoire of *E. faecium* is less expanded compared to *E.*
64 *faecalis*. To date, only few determinants have been entirely characterized and shown to be
65 associated with virulence in animal models for urinary tract infections (UTI) and/or
66 endocarditis. Among them, the Acm adhesin (6,7), the Esp cell surface protein (8), the pili gene
67 cluster *ebpABC_{fm}* (9) and the phosphotransferase system permease BepA (10).
68 In recent years, bacterial regulatory RNAs, referred to as small RNAs (sRNAs), have been
69 described as having a major role in dynamic adaptive responses, including resistance and

70 virulence both in Gram-negative and Gram-positive bacteria (11,12). There again, few data are
71 available about *E. faecium* compared to other widely-studied bacteria such as *Escherichia coli*,
72 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and even *E. faecalis*
73 (11,13,14).

74 In 2017, the first set of transcripts of the *E. faecium* sRNome expressed from non-annotated
75 regions was provided in the reference strain Aus0004 under daptomycin sub-inhibitory
76 conditions. More recently, a global approach based on TSS mapping under physiological non
77 stress-dependent condition (rich media) brought the total current list of sRNA predictions in *E.*
78 *faecium* to about 165 sRNAs (15). To date, 17.5% of these predictions (29/165) were
79 experimentally confirmed by Northern blot (15,16) but no data were provided about their
80 biological functions except for two: sRNA_0030 and sRNA_0160, now renamed Ern0030 and
81 Ern0160, respectively (17,18). The latter has been the most studied and up to now, Ern0160 has
82 been described as playing a role in the bacterial stress response to antibiotics (daptomycin,
83 ciprofloxacin) (16,19) or to biocides (chlorhexidine digluconate, benzalkonium chloride, PVP-
84 iodine) (20) as well as in the intestinal colonization in a mouse model (18). Furthermore, Sinel
85 et al. found that Ern0160 was conserved both in hospital-associated and community-associated
86 lineages as part of the core genome (16). As no functional data were available so far, we aimed
87 to get more about the regulatory networks involving Ern0160 including its targets. In this study,
88 we report two mRNAs targets for Ern0160, one involved in the regulation of *E. faecium*
89 virulence, the other involved in *E. faecium* resistance to fluoroquinolones.

90 **Materials and methods**

91 **Bacterial strains and growth conditions**

92 All bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Supplementary Table S1.

93 The *E. faecium* Aus0004 was chosen as reference strain as it belongs to the hospital-associated
94 clade A (21). The genome was sequenced and annotated in 2003 (GenBank accession no.

95 CP003351) (22). Except for the antimicrobial susceptibility tests performed in Mueller-Hinton
96 (MH; ThermoFischer Scientific) broth, all *E. faecium* strains were grown under ambient air at
97 37°C in brain-heart infusion (BHI; Oxoid) broth and/or agar (Oxoid). When necessary, the
98 media were supplemented with 300 mg/L of spectinomycin or 0,5 mg/L of ciprofloxacin.

99 **Antimicrobial susceptibility testing**

100 Minimal inhibitory concentration (MICs) of first-line antibiotics for the treatment of
101 enterococcal infections (vancomycin, teicoplanin and daptomycin) were determined by the
102 broth microdilution (BMD) reference method in accordance with EUCAST guidelines
103 (www.eucast.org). In addition, MICs of fluoroquinolones (ciprofloxacin and levofloxacin) were
104 determined giving the potential exposure of *E. faecium* within the gut microbiota to these
105 antibiotics frequently used for the treatment of non-enterococcal infections. Each assay was
106 performed at least in triplicate.

107 ***In silico* prediction of interacting targets, RNA isolation and qPCR assays**

108 TargetRNA2 and IntaRNA (v 3.3.1) were used to predict sRNA-mRNA base-pairing
109 interactions (23–25). Total RNAs were isolated from using the phenol/chloroform method at
110 three different time points during growth: mid exponential (ME), late exponential (LE) and
111 early stationary (ES) phase, as previously described (20). Residual chromosomal DNA was
112 removed by treating RNA samples with the Turbo DNA-free kit (Life Technologies).
113 Monitoring of expression levels of predicted mRNA targets was performed by 1-step
114 quantitative reverse-transcription PCR using Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step kit,
115 (ThermoFisher Scientific) as manufacturers' recommendations. The primers used are listed in
116 Supplementary Table S3. Transcript levels were expressed as copy numbers per ng of RNA in
117 each sample based on a calibration range with respective PCR products at concentrations of
118 10^{12} to 10^3 copies/ μ L. For statistical analysis, the two-tailed Mann-Whitney test was used and
119 data were interpreted using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.)

120 ***In vitro* transcription, RNA labeling and gel-shift assays**

121 All RNAs were transcribed from PCR-generated DNA using MEGAscript T7 kit (Ambion) and
122 following the manufacturer's recommendations. The template for transcription was amplified
123 using Aus0004 genomic DNA (InstaGene™ Matrix, BioRad) and forward primers containing
124 T7 promoter sequences (Supplementary Table S3). RNAs were labeled at 5'-end using [γ ³²-P]-
125 ATP (Amersham Biosciences) and T4 polynucleotide kinase (Invitrogen). Labeled and
126 unlabeled RNAs were purified on a 6% acrylamide urea gel, eluted in elution buffer (20 mM
127 Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS) at 37°C, purified by ethanol
128 precipitation, quantified by Qubit (Thermo Fisher Scientific) and stored at -80°C.

129 Gel-shift assays were performed as previously described (26). Briefly, the transcripts were
130 denatured in 50 mM Tris/HEPES (pH 7-7.5), 50 mM NaCl for 2 min at 80 °C, followed by
131 refolding for 10 min at 25 °C after adding MgCl₂ at final concentration of 5 mM and chilled on
132 ice. Binding reactions were performed by incubating about 0.5 pmol of labeled Ern160 with a
133 scale of molar excess of tested mRNA targets in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 5
134 mM MgCl₂ for 20 min at 25°C. To demonstrate specificity, 25 pmol of unlabeled Ern160 and
135 50 pmol of polyU RNAs were added. The samples were supplemented with 10% glycerol and
136 were loaded on a native 5% polyacrylamide gel containing 5% glycerol. The gels were dried
137 and visualized by Typhoon FLA 9500 scanner (GE Healthcare) or directly by autoradiography.

138

139 Results

140 Selection of putative targets of Ern0160

141 *Phenotypic variations*

142 MICs of Aus0004 and isogenic mutants are summarized in Table 1. As expected with a *vanB*-
143 carrying strain, Aus0004 was found to be resistant to vancomycin and susceptible to teicoplanin
144 and daptomycin. For these antibiotics, no difference was found in MIC values neither between
145 Aus0004 and the deleted mutant nor between the complemented strains. By contrast, MICs for
146 fluoroquinolones were not identical between the strains and we noticed that the strains
147 expressing *ern0160* at normal and increased levels (Aus0004 and
148 Aus0004 Δ *ern0160*_pAT29 Ω *ern0160*, respectively) presented repetitively lower MICs than
149 *ern0160*-deleted strains (Aus0004 Δ *ern0160* and Aus0004 Δ *ern0160*_pAT29). In a previous study,
150 Sinel et al. performed RNA-seq analysis on Aus0004 under quinolone sub-inhibitory condition
151 ($1/8 \times$ MIC) and showed that the expression of a resistance gene called *Efmqnr* was induced
152 (19) while *ern0160* was 10-times repressed (unpublished data). Altogether, these phenotypic
153 and transcriptomic results led us to further investigate a possible regulatory network between
154 Ern0160 and mRNA of *Efmqnr*.

155 *Global in silico predictions*

156 Predicted structure of Ern0160 was obtained with Unafold (27) (Figure 1A). IntaRNA and
157 TargetRNA2 were used to predict RNA targets of Ern0160 and the top 10 ones are listed in
158 Table 2. Among them, four were selected for screening of direct interactions. The main hits
159 provided by IntaRNA (p-value 0.0001) were genes EFAU004_01059 and EFAU004_01150.
160 Sequences analysis revealed that they share 97.6% of homology (+15 nucleotides nearly in the
161 middle of EFAU004_01059) and encode for LysM domain-containing proteins organized in
162 monocistronic operons. The predicted interaction zone was identical for both EFAU004_01059
163 and EFAU004_01150, within their ORFs and with the first hairpin of Ern0160 on about 40

164 nucleotides (energy -18.11 kcal/mol) (Table 2) (Figures 1A and 1B). The 15 additional
165 nucleotides of EFAU004_01059 were located > 200 bases downstream of the interaction zone.
166 The third selected target was EFAU004_00722, coding for an ABC transporter ATP-binding
167 protein, because it was significantly predicted by both softwares (energy E= -16.67 kcal/mol,
168 p-value 0.0006 and E= -11.85 kcal/mol, p-value 0.008 with IntaRNA and TargetRNA2,
169 respectively). The interaction zone was identical for both softwares and predicted upstream of
170 the start codon (from -25 to -41).

171 Finally the *ddcP* gene, predicted by TargetRNA2 (E= -13.78 kcal/mol, p-value 0.002) was
172 selected regarding its implication in cell wall biogenesis possibly crossing one of the
173 mechanism of action of Ern0160 suspected with biocide and daptomycin conditions (16,20).
174 The interaction was predicted upstream of the *ddcp* start codon (from -59 to -76).

175 Although it was not initially predicted by softwares, *Efmqnr* transcript was also tested for direct
176 interaction with Ern0160 because of the previous phenotypic observations. The interaction
177 proposed by IntaRNA was located on the 3' extremity of *Efmqnr* ORF, involving 11
178 nucleotides (E= -10.1 kcal/mol). Noteworthy, no overlap was found between the predicted
179 interaction different zones of Ern0160 (Figure 2).

180 **Experimental validation of selected targets**

181 The predicted interactions between Ern0160 and putative mRNA targets were tested *in vitro* by
182 EMSA using synthetic RNAs. Gel retardation assays revealed a complex between Ern0160 and
183 transcripts of EFAU004_1059/1150 (Figure 1C). Its specificity was challenged by deleting 13
184 of 40 nucleotides (1059/1150mut) in the predicted interactive zone of target transcripts that led
185 to the loss of Ern0160 binding ability (Figures 1B and 1C).

186 No RNA-RNA complexes were observed between Ern0160 and *ddcP* nor EFAU004_00722
187 and *Efmqnr* transcripts, ruling out the hypothesis of a direct interaction.

188 **Impacts of Ern0160 on the expression of EFAU004_01059/1150 and Efmqnr**

189 The effects of Ern0160 on the expression level of EFAU004_01059/1150 and Efmqnr and were
190 studied due to promising results mentioned above. For EFAU004_01059/1150, primers were
191 designed to amplify both genes indistinctly (Table S3). No significant shifts at the transcript
192 level was observed when comparing Aus0004 and Aus0004 Δ ern0160 (Figure 3). However, a
193 significant repression was assessed when *ern0160* was overexpressed in complemented strains
194 at late-exponential (-5.7; p = 0.01) and early stationary (-3.0; p = 0.002) growth phases (Figure
195 3). Surprisingly, transcript levels between Aus0004 Δ ern0160 and its homologue containing
196 empty pAT29 were very different, mostly at the later growth stages despite sharing the same
197 genetic background. To make sure that spectinomycin used for selective pressure (300 mg/L)
198 on pAT29-containing strains did not influence the expression level of EFAU004_01059/1150,
199 we performed RT-qPCR on Aus0004 exposed to sub-inhibitory concentrations (SICs) of
200 spectinomycin (4 mg/L). No difference was found when transcript levels were compared to
201 Aus0004 cultured without antibiotic.

202 Study on Efmqnr expression did not reveal significant variations between Aus0004
203 Aus0004 Δ ern0160. Nevertheless, a repressive effect of Ern0160 was evidenced in the strain
204 overexpressing *ern0160* all along the bacterial growth (-9.0, at the ME phase, -10.2 at the LE
205 phase, p = 0.002) with a maximal decrease at ES phase (-14.6, p = 0.002). These results,
206 altogether with phenotypic variations described above, strongly support that Ern0160 indirectly
207 attenuates the expression of Efmqnr.

208

209 Discussion

210 One option used by commensal bacteria such as *E. faecium* to favor colonization is attenuating
211 virulence and/or upgrade resistance. The equilibrium between commensal and pathogen states
212 is strongly related to the host environment even if the transition remains partially unexplained
213 (28). Previous studies demonstrated that *ern0160* expression was modulated by stresses likely
214 encountered in the gastrointestinal niche (daptomycin, ciprofloxacin), as well as in the
215 environment (biocides) (19,20). Here we report the first functional analysis of a regulatory RNA
216 in *E. faecium*. In this study, we identified the first direct mRNA targets of Ern0160,
217 EFAU004_01059 and EUFAU004_01150 that have been previously implicated in virulence in
218 animal model of sepsis and urinary tract infection (29). We also provide elements about the
219 indirect regulation of Ern0160 on *Efmqnr* implicated in fluoroquinolone resistance (19).

220 The biological function EFAU004_01059 and EFAU004_01150 genes have been recently
221 identified as virulence factor in an infection mouse model (29). In their study, transcriptomic
222 analysis revealed their overexpression during infection (+ 9.2 and + 8.4 respectively).
223 Moreover, infection by double mutant strain Δ EFAU004_01059-01150 led to a significantly
224 decreased colonization in the kidneys. Not surprisingly, none of the simple mutant altered the
225 virulence, probably because of the redundant cellular roles of the two genes. Analysis of the
226 peptide sequences indicated high homologous proteins (additional sequence VQAEP in
227 EFAU004_01059) (29) that contain a LysM domain. LysM proteins are widely conserved in
228 all the living kind and display multiple functions including peptidoglycan hydrolases and
229 virulence factors (30). For example, Aaa, FsaP, TspA and intimin are LysM domain-containing
230 proteins of respectively, *S. aureus*, *Francisella tularensis*, *Neisseria meningitidis* and *E. coli*
231 (Bateman and Bycroft, 2000) that have been involved in adherence to human cells (31–34).
232 Despite being clearly implicated in the infection process of *E. faecium*, the genes
233 EFAU004_01059 and EFAU004_01150 do not appear to enhance adherence to hosts cells (29).

234 To date, their mode of actions remains unknown. In our study, RT-qPCR did not allow to assess
235 a regulation of Ern0160 on expression of these genes when studying the strains Aus0004 and
236 Aus0004 Δ ern0160. These *in vitro* tests performed in a rich media are far from *in vivo* infectious
237 processes and may silence virulence factor expression with such favorable conditions. By
238 contrast, a great excess of Ern0160 (Aus0004 Δ ern0160_pAT29 Ω ern0160 versus
239 Aus0004 Δ ern0160_pAT29) highlighted a significant attenuation with a direct sRNA – mRNA
240 interaction. Noteworthy, Ern0160 amounts reach a maximum at the stationary phase (16). As
241 suggested by experimental mouse model, Ern0160 amounts are relevant as it was shown to
242 confer a significant advantage for gut colonization up to an excess amount above which it
243 became deleterious (18). Altogether suggests a sharp regulation of Ern0160 on the pro-virulent
244 genes EFAU004_01059 and EFAU004_01150 as it could maintain *E. faecium* in the
245 colonization/commensal state even when pro-virulence conditions are provided and thus
246 contribute to the commensal true nature of *E. faecium*.

247 Noteworthy, no explanation was provided to clarify why expression levels of
248 EFAU004_01059/1150 were significantly higher in Aus0004 Δ ern0160_pAT29 than in
249 Aus0004 Δ ern0160. Indeed, SIC of spectinomycin (4 mg/L) did not enhance
250 EFAU004_01059/1150 expression in Aus0004 but intercurrent regulations could occur at
251 higher concentration (300 mg/L) used for selective pressure of pAT29 containing strains.

252 The other target of Ern0160 highlighted in this work is Efmqnr transcript, even though the
253 sRNA seemed to exert indirect regulation. The understanding of the regulation of the resistance
254 gene Efmqnr is a matter of concern because despite not being good anti-enterococcal
255 antibiotics, fluoroquinolones are frequently used to treat infections caused by other pathogens.
256 In this context, exposure of *E. faecium* in the gastro-intestinal tractus during a fluoroquinolone
257 treatment could induce Efmqnr expression and allow resistant *E. faecium* to overtake
258 susceptible flora like previously described (35). The gene Efmqnr was initially described in

259 2017 and involved in intrinsic low-level resistance of *E. faecium* to fluoroquinolones (19). It
260 was reported as induced under SIC of ciprofloxacin. The *Efmqnr* knock-out mutant displayed
261 a 1.5- to 4-fold decrease in MICs of fluoroquinolones. Similarly, the overexpression of *Efmqnr*
262 using the pAT29 vector led to 1.5- to 3-fold increase in the MICs. In our study, we showed that
263 a large amount of Ern0160 was able to repress *Efmqnr* expression in rich media. Our results of
264 2-fold increase in MICs of fluoroquinolones for strains harbouring *ern0160* are in accordance
265 with the small-scale variations previously reported (19). To note, these slight variations can be
266 difficult to analyse due to technical fluctuations. Indeed, MIC variations are generally
267 considered as insignificant when ranging one 2-fold dilution. Altogether, these concordant *in*
268 *vitro* results support the hypothesis of a regulation of *Efmqnr* by Ern0160. Nevertheless, further
269 investigations are needed *in vivo* to evaluate the impact of Ern160 on *Efmqnr* expression,
270 especially under sub-inhibitory concentrations of fluoroquinolones. This regulation could
271 provide some clarifications about the selective role of Ern160 during the intestinal colonization
272 reported in a mouse model (18).

273 To our knowledge, this is the first study to explore networks of *E. faecium* regulatory RNAs
274 with notably the identification of the very first set of genes regulated by Ern0160. Our study
275 highlighted that Ern0160 directly regulate virulence genes as well as it is plausibly implicated
276 in fluoroquinolone resistance *in vitro*. Further investigations are needed *in vivo* to fully assess
277 the dual function of Ern0160 as a major key for the infection process of *E. faecium*.

References

1. Banla LI, Salzman NH, Kristich CJ. Colonization of the mammalian intestinal tract by enterococci. *Curr Opin Microbiol.* févr 2019;47:26-31.
2. Goh HMS, Yong MHA, Chong KKL, Kline KA. Model systems for the study of Enterococcal colonization and infection. *Virulence.* 17 nov 2017;8(8):1525-62.
3. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, 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. *Infection Control & Hospital Epidemiology.* nov 2016;37(11):1288-301.
4. García-Solache M, Rice LB. The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. *Clin Microbiol Rev.* 20 mars 2019;32(2):e00058-18.
5. Galloway-Peña J, Roh JH, Latorre M, Qin X, Murray BE. Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*. *PLoS One.* 2012;7(1):e30187.
6. Nallapareddy SR, Singh KV, Murray BE. Contribution of the collagen adhesin *acm* to pathogenesis of *Enterococcus faecium* in experimental endocarditis. *Infect Immun.* sept 2008;76(9):4120-8.
7. Nallapareddy SR, Weinstock GM, Murray BE. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by *Acm*, a new member of the MSCRAMM family. *Mol Microbiol.* mars 2003;47(6):1733-47.
8. Heikens E, Singh KV, Jacques-Palaz KD, van Luit-Asbroek M, Oostdijk EAN, Bonten MJM, et al. Contribution of the enterococcal surface protein *Esp* to pathogenesis of *Enterococcus faecium* endocarditis. *Microbes Infect.* déc 2011;13(14-15):1185-90.
9. Sillanpää J, Prakash VP, Nallapareddy SR, Murray BE. Distribution of genes encoding MSCRAMMs and Pili in clinical and natural populations of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* avr 2009;47(4):896-901.
10. Paganelli FL, Huebner J, Singh KV, Zhang X, van Schaik W, Wobser D, et al. Genome-wide screening identifies phosphotransferase system permease *BepA* to be involved in *Enterococcus faecium* endocarditis and biofilm formation. *J Infect Dis.* 15 juill 2016;214(2):189-95.
11. Felden B, Augagneur Y. Diversity and versatility in Small RNA-mediated regulation in bacterial pathogens. *Front Microbiol.* 2021;12:719977.
12. Diallo I, Provost P. RNA-sequencing analyses of small bacterial RNAs and their emergence as virulence factors in host-pathogen interactions. *Int J Mol Sci.* 27 févr 2020;21(5):1627.
13. Michaux C, Hartke A, Martini C, Reiss S, Albrecht D, Budin-Verneuil A, et al. Involvement of *Enterococcus faecalis* small RNAs in stress response and virulence. *Infect Immun.* sept 2014;82(9):3599-611.

14. Shioya K, Michaux C, Kuenne C, Hain T, Verneuil N, Budin-Verneuil A, et al. Genome-wide identification of small RNAs in the opportunistic pathogen *Enterococcus faecalis* V583. PLoS One. 2011;6(9):e23948.
15. Michaux C, Hansen EE, Jenniches L, Gerovac M, Barquist L, Vogel J. Single-Nucleotide RNA maps for the two major nosocomial pathogens *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. Front Cell Infect Microbiol. 25 nov 2020;10:600325.
16. Sinel C, Augagneur Y, Sassi M, Bronsard J, Cacaci M, Guérin F, et al. Small RNAs in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* involved in daptomycin response and resistance. Sci Rep. 11 sept 2017;7(1):11067.
17. Le Neindre K, Dejoies L, Reissier S, Guérin F, Felden B, Cattoir V. Small RNA-mediated regulation of the *tet(M)* resistance gene expression in *Enterococcus faecium*. Res Microbiol. 5 avr 2022;173(4-5):103941.
18. Reissier S, Le Neindre K, Bordeau V, Dejoies L, Le Bot A, Felden B, et al. The regulatory RNA *ern0160* confers a potential selective advantage to *Enterococcus faecium* for intestinal colonization. Front Microbiol. 10 nov 2021;12:757227.
19. Sinel C, Cacaci M, Meignen P, Guérin F, Davies BW, Sanguinetti M, et al. Subinhibitory concentrations of ciprofloxacin enhance antimicrobial resistance and pathogenicity of *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother. 24 avr 2017;61(5):e02763-16.
20. Dejoies L, Le Neindre K, Reissier S, Felden B, Cattoir V. Distinct expression profiles of regulatory RNAs in the response to biocides in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium*. Sci Rep. 25 mars 2021;11(1):6892.
21. Lebreton F, van Schaik W, Manson McGuire A, Godfrey P, Griggs A, Mazumdar V, et al. Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. mBio. 20 août 2013;4(4):e00534-13-e00534-13.
22. Lam MMC, Seemann T, Bulach DM, Gladman SL, Chen H, Haring V, et al. Comparative analysis of the first complete *Enterococcus faecium* genome. Journal of Bacteriology. 1 mai 2012;194(9):2334-41.
23. Kery MB, Feldman M, Livny J, Tjaden B. TargetRNA2: identifying targets of small regulatory RNAs in bacteria. Nucleic Acids Res. juill 2014;42(Web Server issue):W124-129.
24. Mann M, Wright PR, Backofen R. IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA-RNA interactions. Nucleic Acids Res. 3 juill 2017;45(W1):W435-9.
25. Busch A, Richter AS, Backofen R. IntaRNA: efficient prediction of bacterial sRNA targets incorporating target site accessibility and seed regions. Bioinformatics. 15 déc 2008;24(24):2849-56.
26. Antal M, Bordeau V, Douchin V, Felden B. A small bacterial RNA regulates a putative ABC transporter. J Biol Chem. 4 mars 2005;280(9):7901-8.
27. Markham NR, Zuker M. UNAFold: software for nucleic acid folding and hybridization. Methods Mol Biol. 2008;453:3-31.

28. Lebreton F, van Schaik W, Sanguinetti M, Posteraro B, Torelli R, Le Bras F, et al. AsrR is an oxidative stress sensing regulator modulating *Enterococcus faecium* opportunistic traits, antimicrobial resistance, and pathogenicity. PLoS Pathog. 2012;8(8):e1002834.
29. Cacaci M, Giraud C, Leger L, Torelli R, Martini C, Posteraro B, et al. Expression profiling in a mammalian host reveals the strong induction of genes encoding LysM domain-containing proteins in *Enterococcus faecium*. Sci Rep. 17 août 2018;8:12412.
30. Buist G, Steen A, Kok J, Kuipers OP. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. Mol Microbiol. mai 2008;68(4):838-47.
31. Heilmann C, Hartleib J, Hussain MS, Peters G. The multifunctional *Staphylococcus aureus* autolysin Aaa mediates adherence to immobilized fibrinogen and fibronectin. Infect Immun. août 2005;73(8):4793-802.
32. Melillo A, Sledjeski DD, Lipski S, Wooten RM, Basrur V, Lafontaine ER. Identification of a *Francisella tularensis* LVS outer membrane protein that confers adherence to A549 human lung cells. FEMS Microbiol Lett. oct 2006;263(1):102-8.
33. Oldfield NJ, Bland SJ, Taraktsoglou M, Dos Ramos FJ, Robinson K, Wooldridge KG, et al. T-cell stimulating protein A (TspA) of *Neisseria meningitidis* is required for optimal adhesion to human cells. Cell Microbiol. févr 2007;9(2):463-78.
34. Bateman A, Bycroft M. The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). J Mol Biol. 16 juin 2000;299(4):1113-9.
35. de Lastours V, Maugy E, Mathy V, Chau F, Rossi B, Guérin F, et al. Ecological impact of ciprofloxacin on commensal enterococci in healthy volunteers. J Antimicrob Chemother. 1 juin 2017;72(6):1574-80.
36. Trieu-Cuot P, Carlier C, Poyart-Salmeron C, Courvalin P. A pair of mobilizable shuttle vectors conferring resistance to spectinomycin for molecular cloning in *Escherichia coli* and in gram-positive bacteria. Nucleic Acids Res. 25 juill 1990;18(14):4296.

Table 1 : MIC_{S24h} for clinically relevant antibiotics (mg/L) on Aus0004 and isogenic mutants.

	MIC _{S24h} (mg/L)				
	Vancomycin	Teicoplanin	Daptomycin	Ciprofloxacin	Levofloxacin
Aus0004	8	0.5	2	4	2
Aus0004 Δ <i>ern0160</i>	8	0.5	2	8	4
Aus0004 Δ <i>ern0160</i> _pAT29	8	< 0.25	2	4	8
Aus0004 Δ <i>ern0160</i> _pAT29 Ω <i>ern0160</i>	8	< 0.25	2	2	4

Tests were performed in Mueller-Hinton broth (MHB) with addition of spectinomycin (300 mg/L final concentration) for complemented strains.

Table 2 : List of the top 10 predicted of Ern0160 with TargetRNA2 and Intra-RNA softwares in *E. faecium* Aus0004.

Rang	P-value	COG	Code	Name	Gène	Annotation	Energy (Kcal/mol)
<i>IntaRNA</i>							
1	0.0001	S	COG1652	EFAU004_01059	-	LysM domain-containing protein	-18.11
2	0.0001	S	COG1652	EFAU004_01150	-	LysM domain-containing protein	-18.11
3	0.0003	S	COG4807	EFAU004_00283	-	hypothetical protein	-17.15
4	0.0004	O	COG0544	EFAU004_01666	<i>tig</i>	trigger factor	-16.98
5	0.0006	V	COG1136	EFAU004_00722	-	ABC transporter ATP-binding protein	-16.67
6	0.0007	-	-	EFAU004_00853	-	hypothetical protein	-16.58
7	0.0007	-	-	EFAU004_01406	-	hypothetical protein	-16.58
8	0.001	-	-	EFAU004_01707	-	DNA-binding domain excisionase family	-16.1
9	0.001	S	COG2898	EFAU004_01232	-	lysyl-tRNA synthetase	-16.02
10	0.001	M	COG0768	EFAU004_00870	-	penicillin binding protein transpeptidase domain protein (PBP-5)	-15.98
<i>Target RNA 2</i>							
1	0.002	K	COG1278	EFAU004_02199	<i>cspE</i>	major cold shock protein CspE	-13.93
2	0.002	M	COG1686	EFAU004_01934	<i>ddcP</i>	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	-13.78
3	0.004	PH	COG1120	EFAU004_01755	<i>fhuC</i>	ferrichrome transport ATP-binding protein FhuC	-12.97
4	0.004	V	COG1132	EFAU004_02769	-	ABC transporter ATP-binding protein	-12.8
5	0.005	R	COG4626	EFAU004_01617	-	phage terminase-like protein large subunit	-12.62
6	0.006	S	COG4333	EFAU004_00305	-	hypothetical protein	-12.31
7	0.006	P	COG0025	EFAU004_01196	-	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	-12.3
8	0.008	V	COG1136	EFAU004_00722	-	ABC transporter ATP-binding protein	-11.85
9	0.008	J	COG0093	EFAU004_00105	<i>rlpN</i>	rplN 50S ribosomal protein L14	-11.84
10	0.009	-	-	EFAU004_00539	-	hypothetical protein	-11.69

Selected targets for experimental validation by EMSA are in bold characters: the two LysM proteins were selected regarding the lowest p-value of the prediction, ABC transporter was predicted by both softwares and *ddcP* was chosen due to its implication in cell wall biogenesis.

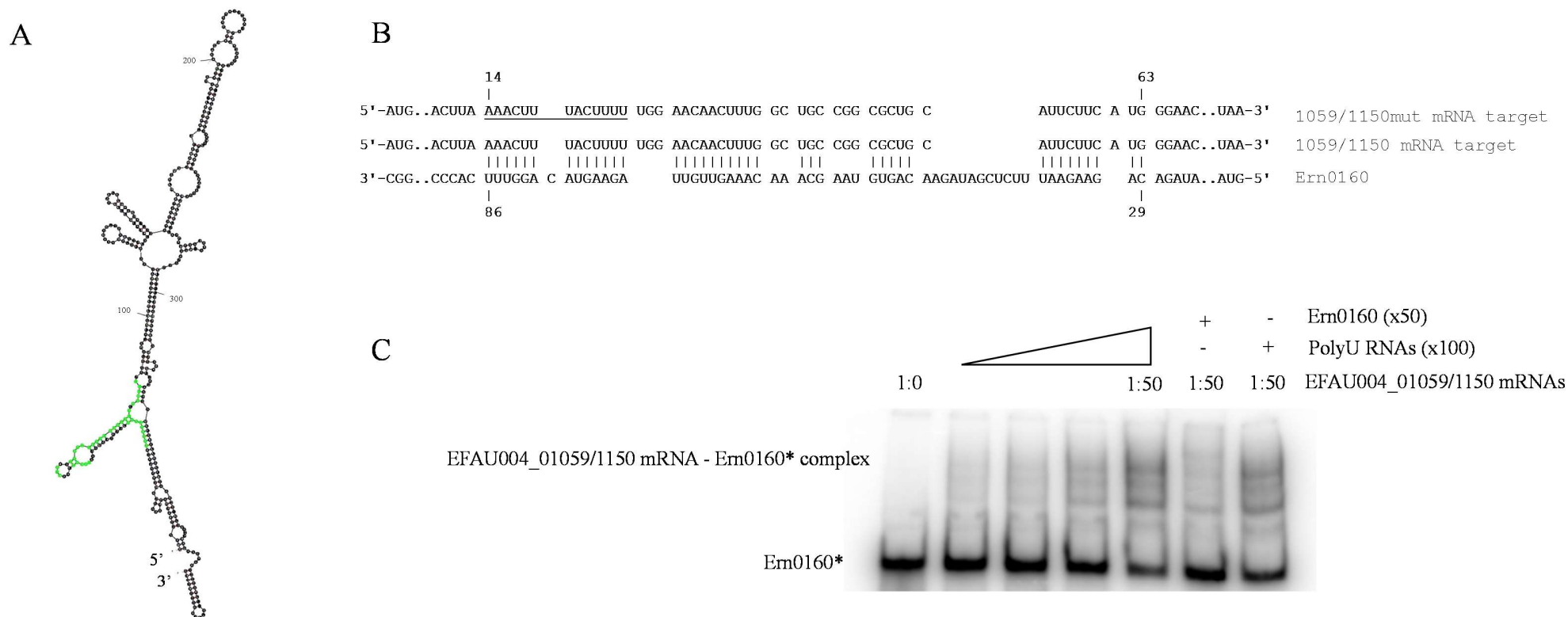


Figure 1. Ern0160 interacts with genes encoding LysM domain containing proteins. **(A)** Schematic presentation of Ern0160 secondary structure. The sequence involved in interaction with mRNA targets is highlighted in green. **(B)** Interaction between Ern0160 and common sequence of EFAU004_01059 and EFAU004_01150 mRNA was predicted by IntaRNA ($E = -18.11$ kcal/mol). Interaction was challenged by deletion of 13 nucleotides (underlined) in the sequence of interest (1059/1150mut). **(C)** Complex formations between Ern0160 with mRNA of EFAU004_01059/1150 and 1059/1150mut were analysed by native gel retardation assays. Shift assays of purified labeled Ern0160 (Ern0160*) were performed with increasing amounts of mRNA targets (0.25, 0.5, 1.0 and 2.5 μ M).

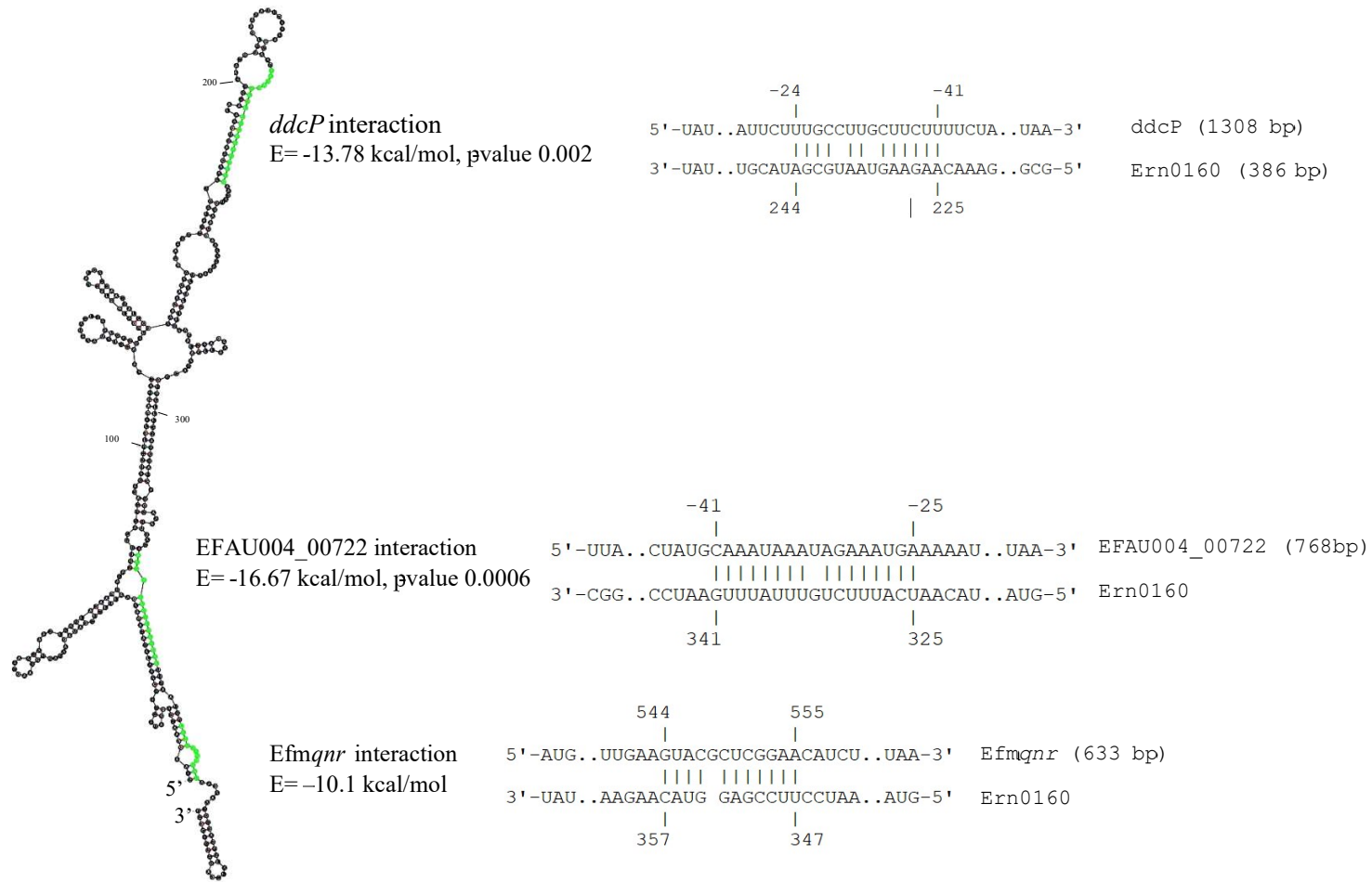


Figure 2. *In silico* prediction of Ern0160 interactions with mRNA targets of genes *ddcP*, EFAU004_00722 and Efmqnr.

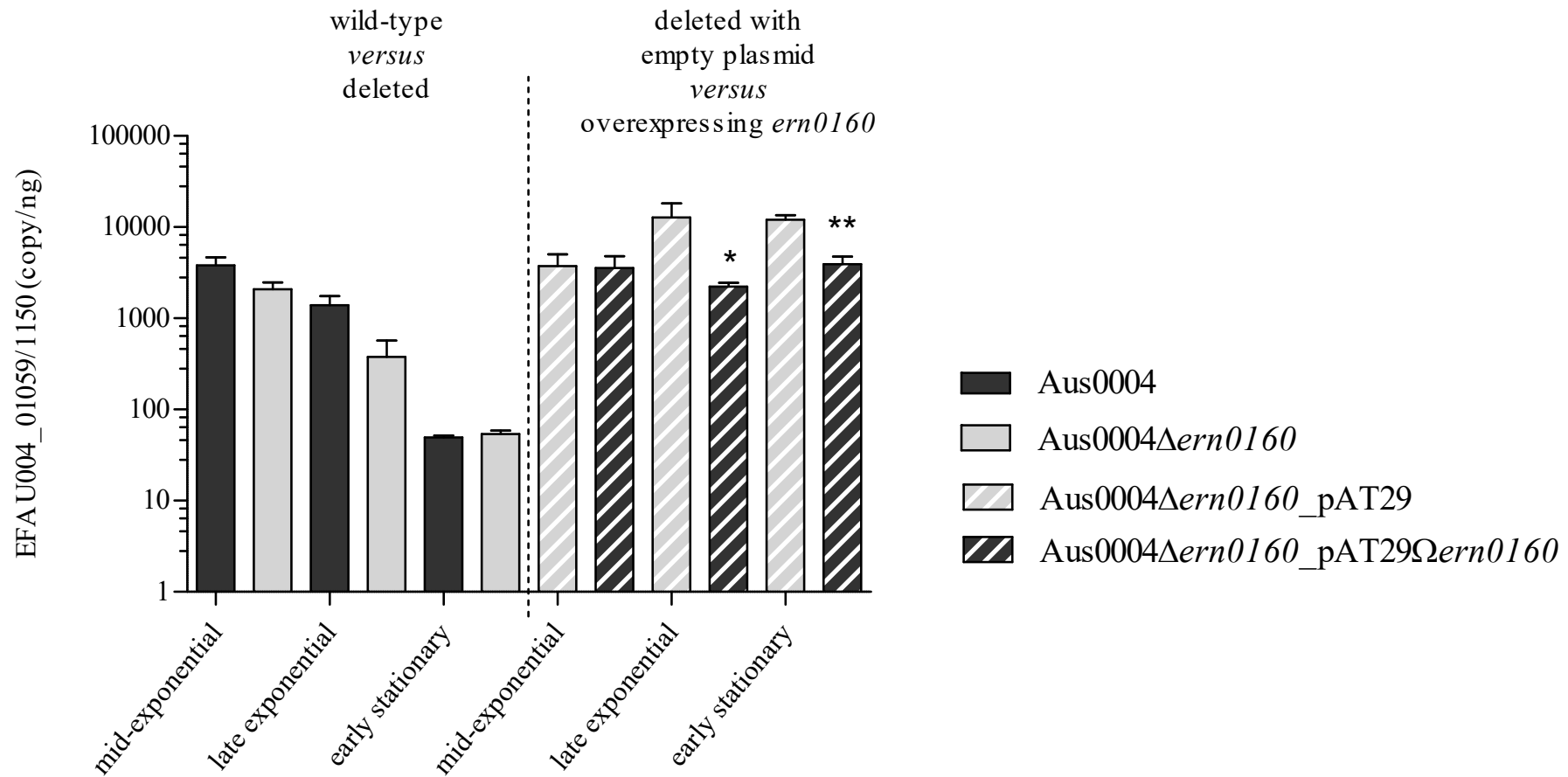


Figure 3. *Ern0160* affects the expression of EFAU004_01059/1150. Analysis of transcript levels in Aus0004 and the three isogenic mutants were performed at three growth phases. Aus0004 wild-type strain and *ern0160*-deleted mutant are figured in black and grey, respectively; complemented strains with empty plasmid and overexpressing *ern0160* are figured in dashed grey and black, respectively. Error bars represent standard deviation. *: p-value <0.05 ; **: p-value < 0.001

Table Supplementary 1. Bacterial strains and plasmid

Strains	Relevant characteristics	References
Aus0004	<i>vanB</i> -positive reference strain, isolated in Australia, 1998	(22)
Aus0004 Δ <i>ern0160</i>	<i>ern0160</i> -deleted Aus0004	(18)
Aus0004 Δ <i>ern0160</i> _pAT29	Aus0004 Δ <i>ern0160</i> carrying empty pAT29 vector	(18)
Aus0004 Δ <i>ern0160</i> _pAT29 Ω <i>ern0160</i>	Aus0004 Δ <i>ern0160</i> carrying recombinant plasmid pAT29 Ω <i>ern0160</i>	(18)
Plasmid	Relevant characteristics	References
pAT29	High-copy-number promoterless shuttle vector used for cloning (Spc ^r)	(36)

Table Supplementary 2 Primers

Name	Sequences	Use	References
<i>Efmqnr</i> for	TGGGAACACGTTATTCGAGA	RT-qPCR	This study
<i>Efmqnr</i> rev	GCGCTTGATAAGACAGAGTGC	RT-qPCR	This study
1059/1150 for	CAACAGAAGGCTCTGCACAA	RT-qPCR	This study
1059/1150 rev	TGCTGTGTAAGAACCGCTTG	RT-qPCR	This study
T7 <i>ern0160</i> for	TAATACGACTCACTATAGGGTAAGGAAGGAGGATACCATC	EMSA	This study
T7 <i>ern0160</i> rev	GCCGAGCTCTCGATAAGCTCGGCTTTCTTGTACCTC	EMSA	This study
T7 ABC transp. 722 for	TAATACGACTCACTATAGGGTTTAATTTTGCTGAATAAAA	EMSA	This study
T7 ABC transp. 722 rev	TGAATGAGATATTATCTAAGGCTTTGACGGGAGAAAGTTT	EMSA	This study
T7 <i>ddcP</i> for	TAATACGACTCACTATAGGGTTCATAACGTGCGTTCTTATCCT	EMSA	This study
T7 <i>ddcP</i> rev	AAGCTGAAGATACTTTCAAAGTAAATGCAAAAGCAGCCT	EMSA	This study
T7 <i>Efmqnr</i> for	TAATACGACTCACTATAGGGATGATTTTTCCTAAAGTTAA	EMSA	This study
T7 <i>Efmqnr</i> rev	TTATACTACTTTTATTTGTAAAAATTTTCTAGCAAAACCAA	EMSA	This study
T7 1059/1150 for	TAATACGACTCACTATAGGGTTTTACCTATGAAATATTTT	EMSA	This study
T7 1059/1150 rev	CAGGTTAATATCAGAAATTGAATTTGATTCTGCAATGGC	EMSA	This study
T7 1059/1150mut for	TGGAACAAC TTTGGCTGCCGGCGCTGCATTCTTCATGGGA	EMSA	This study
T7 1059/1150mut rev	GGCAGCCAAAGTTGTTCCATAAGTGATGTCATGAAAAATCT	EMSA	This study

3. Analyses supplémentaires

3.1. Système rapporteur à double plasmide

L'étude *in vivo* de la régulation de l'Ern0160 a été effectuée sur 2 cibles, le gène de résistance aux fluoroquinolones *Efmqnr* en raison des variations phénotypiques observées et décrites dans l'article n°2 et les gènes homologues EFAU004_01059 et EFAU004_01150 car les retards sur gel nous ont permis de montrer qu'ils étaient des cibles directes de l'Ern0160. La construction de pICS3 exprimant *ern0160* sous le contrôle du promoteur *PamiA* a été correctement obtenue et a permis la préparation de la suspension de phage 80α. Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de mener à terme les constructions avec les cibles, pour des raisons différentes pour chaque cible.

3.1.1. Mise en échec du système pour les cibles directes de l'Ern0160

Pour l'essai concernant les cibles à interaction directe EFAU004_01059 et EFAU004_01150, nous n'avons pas réussi à obtenir le plasmide pCN33 contenant la fusion du gène cible en phase avec le gène de la GFP malgré de nombreux essais. Etant donné que les nucléotides prenant part à l'interaction prédite avec l'Ern0160 étaient ceux codant pour le peptide signal et le domaine LysM, nous avons essayé d'obtenir des formes tronquées dans chacun de ces éléments. Au total, 3 versions pour l'amplification de la portion des gènes comprenant la zone d'interaction prédite avec l'Ern0160 ont été testées (Figure 17). Malgré cela, aucun clone obtenu après transformation dans *E. coli* DH5α n'a été validé après séquençage en raison de mutations systématiques dans la séquence du gène cible, aboutissant à un décalage du cadre de lecture et de la perte de phase avec le gène *gfp*. Même sans fonction précise connue à l'heure actuelle, les produits de ces gènes sont des protéines contenant un domaine LysM qui est retrouvé dans une grande variété de protéines extracellulaires et récepteurs de surface du monde procaryote [131]. Aucune homologie de ces gènes avec

E. coli n'a été trouvée, et l'absence de clone valide laisse à penser qu'une toxicité des produits de ces gènes de *E. faecium* rend impossible leur expression chez *E. coli*.

	Peptide signal	Domaine conservé YG	
EFAU004_01059	MTSLKTLFLFGTTLAAGAAFFMGTTAHADEAYTVQSGDTLSTISQKYVGDNSLINAIAESN	YTVQSGDTLSTISQKYVGDNSLINAIAESN	60
EFAU004_01150	MTSLKTLFLFGTTLAAGAAFFMGTTAHADEAYTVQSGDTLSTISQKYVGDNSLINAIAESN	YTVQSGDTLSTISQKYVGDNSLINAIAESN	60

EFAU004_01059	SISDINLIYSGQQLTIPTEGSAQAAAE PQAAVQEA PVQAE PVQAE QPVVQETVQTE TQAA	SISDINLIYSGQQLTIPTEGSAQAAAE PQAAVQEA PVQAE PVQAE QPVVQETVQTE TQAA	120
EFAU004_01150	SISDINLIYSGQQLTIPTEGSAQAAAE PQAAVQEA PVQAE PVQAE QPVVQETVQTE KQAA	SISDINLIYSGQQLTIPTEGSAQAAAE PQAAVQEA PVQAE PVQAE QPVVQETVQTE KQAA	115

EFAU004_01059	PVAETQPAPAVTE TAATPASTSSAKEWIAQKES SSGSYTATNGRYIGRYQLDSSYLNGDYS	PVAETQPAPAVTE TAATPASTSSAKEWIAQKES SSGSYTATNGRYIGRYQLDSSYLNGDYS	180
EFAU004_01150	PVAETQPAPAVTE TAATPASTSSAKEWIAQKES SSGSYTATNGRYIGRYQLDSSYLNGDYS	PVAETQPAPAVTE TAATPASTSSAKEWIAQKES SSGSYTATNGRYIGRYQLDSSYLNGDYS	175

EFAU004_01059	AANQERVAEQYVTSRYGSWEAAKAFWEANGWY	212	
EFAU004_01150	AANQERVAEQYVTSRYGSWEAAKAFWEANGWY	207	

Figure 17 : Alignement des protéines à domaines LysM codées par les gènes cibles de Ern0160.

Le domaine LysM est surligné en jaune. Le peptide signal d'adressage à la membrane et le domaine YG conservé au sein des protéines LysM sont encadrés en bleu. Les séquences d'acides aminés issues de l'utilisation des 3 différents couples d'amorces utilisés sont soulignés : la forme longue en orange, la forme tronquée du domaine conservé YG en vert et la forme tronquée du peptide signal en bleu.

3.1.2. Mise en échec du système pour la cible Efmqnr

Pour l'étude de cette cible, la construction plasmidique dans pCN33 a été correctement obtenue et vérifiée après séquençage. Après transformation dans *S. aureus* RN4220, aucune fluorescence n'a pu être observée signifiant donc l'absence de production de la protéine de fusion fonctionnelle. Du fait de l'expression de cette fusion sous le contrôle du promoteur constitutif *PtufA*, nous avons pu écarter un défaut de transcription et plutôt suspecter une anomalie dans les processus ultérieurs. Comme précisé dans l'article n°2, l'interaction prédite entre Ern0160 et l'ARNm de *Efmqnr* est située dans les extrémités 3' de ces gènes. Pour l'étude de cette interaction dans le système de double plasmide, la majorité du gène *Efmqnr* (579 sur 633 nucléotides) a donc été incluse pour la construction de la fusion avec le gène *gfp*. Habituellement, les interactions en 5' des gènes cibles sont privilégiées pour la mise en place de ce modèle d'étude. Ici, une taille finale trop importante de la fusion pourrait être à l'origine de régulations empêchant l'obtention de la protéine fusionnée fonctionnelle.

3.2. Transcriptome d'Aus0004 en fonction de l'expression de *ern0160*

3.2.1. Analyse globale RNA-seq

La dispersion des 'reads' était satisfaisante pour les 4 souches reflétant la bonne reproductibilité inter-duplicats ($R^2 > 0,95$) (Annexe 4). Le RNA-seq a permis de valider définitivement la souche délétée ainsi que les souches de complémentation construites par le Dr. Le Neindre. La souche de surexpression exprimait plus de 100 fois plus *ern0160* que la souche native Aus0004 (RPKM normalisé).

Selon les critères d'interprétation définis précédemment (RPKM ≥ 10 , FC $\geq |2|$, p-value ajustée $\leq 0,05$, Edge-test FDR correction), un total de 97 gènes présentait des profils d'expression différents entre la souche Aus0004 et la souche délétée de *ern0160* dont 63 étaient réprimés dans la souche mutée (Annexe 8 et Annexe 9). Ces gènes étaient majoritairement de la classe COG des systèmes de transport et de métabolisme des molécules carbonées et présentaient de faibles variations d'expression à l'exception de 8 gènes ayant un FC < -10 et 1 seul à -164 dans le délété par rapport à Aus0004. Les gènes surexprimés dans le mutant présentaient également des variations minimales (FC $+3,4$ en moyenne). Ces résultats tendent à penser que le transcriptome serait altéré assez subtilement par l'Ern0160 à l'état constitutif et que sa présence favoriserait plutôt l'expression des gènes de Aus0004. Concernant les souches de complémentation, le nombre de gènes avec expression altérée était 4 fois supérieur. Parmi ces 466 gènes, 89% était moins exprimés en présence de *ern0160* avec de nouveau, une part majoritaire de gènes ayant des fonctions dans des systèmes de transport et de métabolisme des molécules carbonées (Annexe 10 et Annexe 11). Les niveaux de variations étaient plus importants avec 36 gènes présentant un FC < -10 dont 3 FC > -100 . Ici, la présence de l'Ern0160 en quantité importante était plutôt en lien avec une répression des gènes, ce qui était peu cohérent avec les données obtenues avec l'autre couple de souches. Pour preuve, un total de 42 gènes communs avec expression altérée a été trouvé dans les 2 couples de souches et les variations ont été incohérentes pour 41 d'entre eux. En effet l'Ern0160 semblait en réguler positivement

l'expression lorsque présent en quantité physiologique mais avec l'effet opposé dans la souche de surexpression. Ces variations ont été considérées comme non spécifiques et l'analyse n'a pas été poursuivie. Une seule cible présentait des variations d'expression cohérentes entre les 2 couples de souches. Il s'agissait du gène EFAU004_02176 codant à une « thioredoxin domain-containing protein » et dont l'expression semblait régulée négativement par l'Em0160 (- 2,7 p-value < 0,05 et - 6,4 p-value < 10⁻¹⁴ respectivement).

3.2.2. Focus sur EFAU004_02176

Les thiorédoxines (Trx) sont de protéines à groupement thiol (-SH) impliquées dans les processus de stress oxydant. Elles fonctionnent en couple avec les thiorédoxine réductases (TrxR), qui les restaurent à leur état réduit dans une réaction NADPH-dépendante (Figure 18) [132]. Chez Aus0004, le seul gène annoté comme codant une thiorédoxine réductase était EFAU004_02003. Etonnement, les résultats RNA-seq n'ont montré aucune altération de l'expression de ce gène en fonction du niveau d'expression de *erm0160*. L'altération d'un seul des deux gènes constituant le système paraissait peut cohérente avec leurs fonctionnements intrinsèquement liés.

Une expérience de retard sur gel a été effectuée pour tenter de valider cette unique cible prédite. Aucun complexe n'a été observé entre les deux ARN. L'étude de cette cible putative n'a pas été poursuivie.

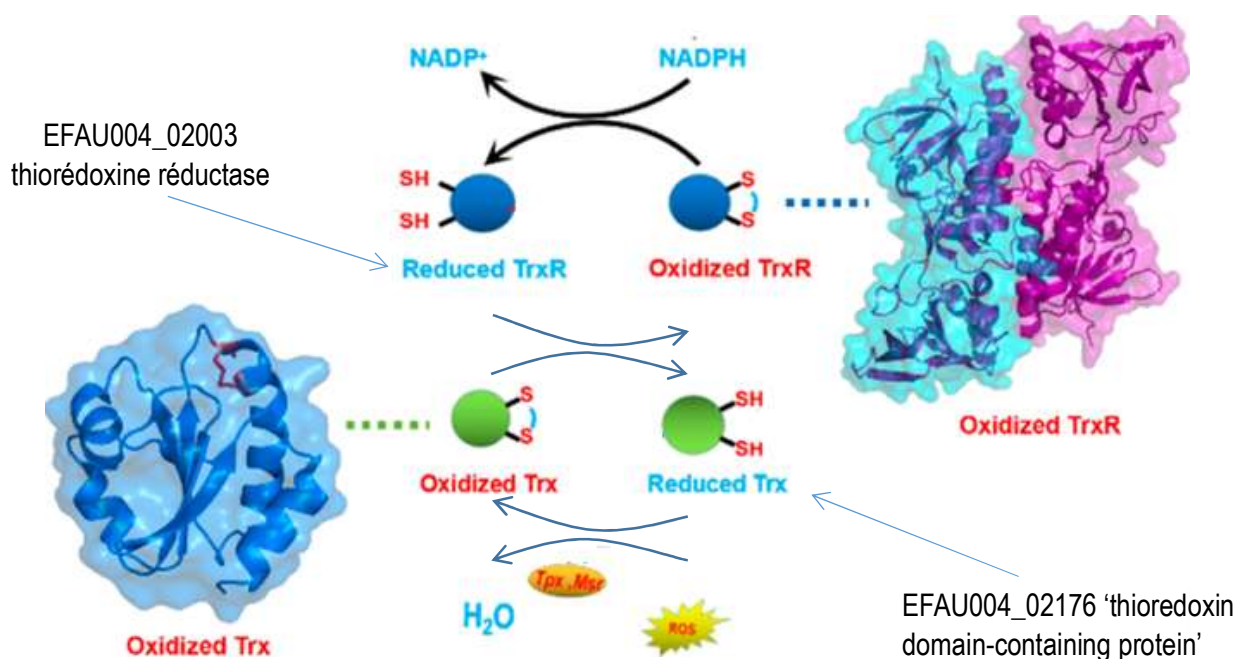


Figure 18 : Fonctionnement du système anti-oxydant thiorédoxine Trx - TrxR, adapté de Liao *et al.* (132).

3.3. Comparaison RNA-seq et RT-qPCR pour les cibles prédites *in silico*

Devant les résultats de RNA-seq décevants là-aussi pour la détection de nouvelles cibles de l'Ern0160, nous avons souhaité comparer les résultats obtenus par RT-qPCR faites sur les cibles prédites *in silico* et ceux obtenus en RNA-seq, indépendamment des critères d'interprétation initialement choisis (Tableau 12). Les résultats de RT-qPCR obtenus pour les cibles EFAU004_01059/1150 et *Efmqnr* sont présentés en détail dans l'article n°2. A noter, aucune variation significative n'a été mise en évidence en comparant les souches native et délétée. Une explication possible est que l'Ern0160 régulerait ces gènes avec un niveau de finesse situé en-deçà du seuil de détection des techniques *in vitro* employées. Des résultats interprétables étaient obtenus pour les souches complémentées. Les résultats de RNA-seq et de RT-qPCR étaient cohérents pour l'étude de l'expression des gènes EFAU004_01059/1150 pour lesquels une répression significative était mise en évidence. L'autre cible pour laquelle des résultats cohérents ont été trouvés entre RNA-seq et RT-qPCR est le gène *ddcP* avec un effet répresseur significatif de l'Ern0160. Cette régulation serait indirecte puisque,

comme précisé dans l'article n°2, aucune interaction directe n'a pu être mise en évidence entre l'Ern0160 et l'ARNm de *ddcP*. En revanche, le RNA-seq n'a pas confirmé les variations significatives de l'expression trouvées en RT-qPCR pour les gènes *Efmqnr* et EFAU004_00722. Là-encore, il s'agirait de cibles indirectes en raison de l'absence d'interaction ARN – ARN objectivée sur gel retard.

Tableau 12 : Comparatif synthétique des résultats obtenus en RT-qPCR et RNA-seq pour les cibles sélectionnées.

	Données RT-qPCR	Données RNA-seq
EFAU004_01059/1150		
<i>Aus0004 / Aus0004Δern0160</i>	ns	ns
<i>Aus0004Δern0160_pAT29Ωern0160 / Aus0004Δern0160_pAT29</i>	répresseur x - 5,7 (p=0,01)	répresseur x - 2,95 et -3,03 (p<0,001)
Efmqnr		
<i>Aus0004 / Aus0004Δern0160</i>	ns	ns
<i>Aus0004Δern0160_pAT29Ωern0160 / Aus0004Δern0160_pAT29</i>	répresseur x -10,2 (p=0,002)	ns
EFAU004_00722		
<i>Aus0004 / Aus0004Δern0160</i>	ns	ns
<i>Aus0004Δern0160_pAT29Ωern0160 / Aus0004Δern0160_pAT29</i>	répresseur x - 2,9 (p=0,05)	ns
ddcP		
<i>Aus0004 / Aus0004Δern0160</i>	ns	ns
<i>Aus0004Δern0160_pAT29Ωern0160 / Aus0004Δern0160_pAT29</i>	inducteur x 1,6 (p=0,002)	inducteur x 1,4 (p=0,01)

ns : non significatif

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail avait pour objectif d'explorer le rôle de sARN dans la réponse au stress antimicrobien pour les bactéries *S. aureus* et *E. faecium*. Les antiseptiques ont été choisis pour exercer ce stress en raison de leur usage très répandu dans les structures de soins dans lesquelles ces deux pathogènes nosocomiaux circulent activement. L'état des connaissances initiales pour les sARN était diamétralement opposé entre les deux bactéries mais l'implication de ces sARN en réponse à un tel stress restait inexplorée. Dans le premier axe, les considérations clinico-biologiques pour la mise au point des protocoles d'études des antiseptiques sur les différentes souches a tenu la thématique des sARN un peu éloignée. En effet, la méthodologie solide des protocoles de sensibilité aux antiseptiques a nécessité une mise au point intégrale pour chaque molécule sur chacune des deux souches considérées. Certains travaux concernant cette partie restent inachevés et leur poursuite, notamment concernant le rôle des transporteurs ABC dans l'efflux d'antiseptique tels que la chlorhexidine et le chlorure de benzalkonium pourraient améliorer les connaissances sur les mécanismes d'adaptation de *E. faecium* face aux biocides.

Une fois cette étape méthodologique franchie, les réseaux de régulation médiés par certains sARN de fonction connue de *S. aureus* ont pu être testés cependant que la récolte des données sur les sARN de *E. faecium* était initiée. Les résultats obtenus ont montré que de nombreuses variables entrent en jeu dans ces réseaux de régulations, dépendant à la fois de l'espèce bactérienne considérée, de la molécule antimicrobienne utilisée et des médiateurs d'adaptation étudiés. Chez *S. aureus*, des signaux intéressants ont été relevés tel que la diminution de l'expression de l'ARNIII en présence de CSI de chlorhexidine ou l'augmentation de l'expression de SprD et SprX en présence de chlorure de benzalkonium et de PVP-iodée. Le constat de la répression de l'ARNIII sous pression chlorhexidine a été également rapporté par Baseri *et al.* dans le cadre de l'étude des variations phénotypiques et génotypiques provoquées par le mésusage de la chlorhexidine sur *S. aureus* [133] mais comme pour notre travail, aucune corrélation avec des conséquences sur la pathogénicité n'a été effectuée. En effet, pour des questions de temps, cette partie de

nos données n'a pas pu être exploitée plus en profondeur, notamment sur les notions de virulence et de sensibilité aux glycopeptides *in vivo*. A l'avenir, l'exploitation de ces résultats pourraient éclairer les fonctions de ces sARN sous un jour différent, en réponse à la pression antiseptique.

Chez *E. faecium*, les travaux initiés par le Dr. Clara Sinel et poursuivis ici ont permis d'établir que certains sARN étaient impliqués dans la réponse aux antimicrobiens. En présence de CSI de daptomycine, l'expression des sARN_0120 et Ern0160 étaient significativement réprimés ($p < 0,05$) [110]. De même, nous avons montré que la présence d'un stress antiseptique entraînait la répression de l'expression de l'ensemble des 9 sARN expérimentalement validés, sauf pour la PVP-iodée. Devant l'accumulation de résultats le concernant, l'Ern0160 a été considéré comme un sARN biologiquement pertinent car son expression a été montré comme modulée par des signaux de stress de paroi exercé par des antibiotiques (daptomycine) et des antiseptiques (chlorhexidine, chlorure de benzalkonium et triclosan) ainsi que par des signaux de stress d'intégrité de l'ADN induits par la ciprofloxacine [110,112,124].

Dans le cadre de l'étude approfondie des fonctions de l'Ern0160, ce travail a permis la découverte des toutes premières cibles directes d'un sARN de *E. faecium* et dont le rôle dans la pathogénicité a été rapporté par une autre équipe à partir d'un modèle murin d'infections systémique et urinaire. Nos résultats *in vitro* sont en faveur d'une régulation négative de l'Ern0160 sur ses cibles directes. La possible atténuation de la virulence exercée par l'Ern0160 via la répression de ces gènes cependant reste à vérifier dans des expériences *in vivo*, sur modèle murin mais également sur modèle invertébré *Galleria mellonella*, ces deux modèles étant disponibles au laboratoire de l'unité de recherche U1230.

Enfin, la forte suspicion de régulation indirecte de l'Ern0160 sur le gène *Efmqnr* de résistance aux fluoroquinolones semble associée à un phénotype avec l'observation de CMI plus faibles pour les souches possédant le gène *ern0160*. Les variations observées, bien que faibles étaient cohérentes avec celles trouvées lors de première description de ce gène par Sinel *et al.* en 2017 et mises sur le compte de son rôle

dans la résistance intrinsèque à bas niveau des entérocoques aux fluoroquinolones [129]. Dans ce travail, les auteurs ont décrit un potentiel site de fixation LexA dans le promoteur du gène, laissant penser que le gène *Efmqnr* pourrait être soumis à régulation par le système SOS, auquel l'Ern0160 pourrait également prendre part. D'autres expérimentations, là aussi possiblement basées sur des modèles animaux pourraient venir renforcer ces arguments malgré l'absence d'interaction directe entre les deux protagonistes.

Les résultats de ce travail de thèse, associés à ceux obtenus par les Dr. Le Neindre et Reissier, ont apporté de nouvelles connaissances sur le pathogène opportuniste *E. faecium* par le versant jusqu'alors peu étudié de la régulation médiée par les sARN.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Rice LB (2008) Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases* 197:1079–1081.
2. Voyich JM, Braughton KR, Sturdevant DE, Whitney AR, Saïd-Salim B, Porcella SF, Long RD, Dorward DW, Gardner DJ, Kreiswirth BN, Musser JM, DeLeo FR (2005) Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *J Immunol* 175:3907–3919.
3. Valero A, Pérez-Rodríguez F, Carrasco E, Fuentes-Alventosa JM, García-Gimeno RM, Zurera G (2009) Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *Int J Food Microbiol* 133:186–194.
4. van Belkum A, Verkaik NJ, de Vogel CP, Boelens HA, Verveer J, Nouwen JL, Verbrugh HA, Wertheim HFL (2009) Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. *J Infect Dis* 199:1820–1826.
5. Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5:751–762.
6. Cheung GYC, Bae JS, Otto M Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence* 12:547–569.
7. Otto M (2014) *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr Opin Microbiol* 0:32–37.
8. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ, ACCP/SCCM Consensus Conference Committee (2009) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest* 136:e28
9. Sakr A, Brégeon F, Mège J-L, Rolain J-M, Blin O (2018) *Staphylococcus aureus* nasal colonization: an update on mechanisms, epidemiology, risk factors, and subsequent infections. *Frontiers in Microbiology* 9:
10. Wertheim HFL, Vos MC, Ott A, van Belkum A, Voss A, Kluytmans JAJW, van Keulen PHJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Meester MHM, Verbrugh HA (2004) Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet* 364:703–705.
11. von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G (2001) Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med* 344:11–16.
12. Bode LGM, Kluytmans JAJW, Wertheim HFL, Bogaers D, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Roosendaal R, Troelstra A, Box ATA, Voss A, van der Tweel I, van Belkum A, Verbrugh HA, Vos MC (2010) Preventing surgical-site infections in nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 362:9–17.

13. Huang SS, Singh R, McKinnell JA, Park S, Gombosev A, Eells SJ, Gillen DL, Kim D, Rashid S, Macias-Gil R, Bolaris MA, Tjoa T, Cao C, Hong SS, Lequieu J, Cui E, Chang J, He J, Evans K, Peterson E, Simpson G, Robinson P, Choi C, Bailey CC, Leo JD, Amin A, Goldmann D, Jernigan JA, Platt R, Septimus E, Weinstein RA, Hayden MK, Miller LG, Project CLEAR Trial (2019) decolonization to reduce postdischarge infection risk among MRSA carriers. *N Engl J Med* 380:638–650.
14. Recommandations - Gestion préopératoire du risque infectieux - SF2H- 2013
15. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K (2000) A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1549–1555.
16. Weiner-Lastinger LM, Abner S, Edwards JR, Kallen AJ, Karlsson M, Magill SS, Pollock D, See I, Soe MM, Walters MS, Dudeck MA (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.
17. ONERBA (2018) Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques (ONERBA) - rapport d'activité 2017
18. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y (2003) Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 36:53–59.
19. Bal AM, David MZ, Garau J, Gottlieb T, Mazzei T, Scaglione F, Tattevin P, Gould IM (2017) Future trends in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection: An in-depth review of newer antibiotics active against an enduring pathogen. *J Glob Antimicrob Resist* 10:295–303.
20. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M (2014) Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol* 12:49–62.
21. Tam K, Torres VJ (2019) *Staphylococcus aureus* secreted toxins & extracellular enzymes. *Microbiol Spectr* 7:10.1128/microbiolspec.GPP3-0039–2018.
22. Murray BE (1990) The life and times of the Enterococcus. *Clin Microbiol Rev* 3:46–65.
23. Sherman JM, Mauer JC, Stark P (1937) *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* 33:275–282.
24. Thammavongs B, Corroler D, Panoff JM, Auffray Y, Boutibonnes P (1996) Physiological response of *Enterococcus faecalis* JH2-2 to cold shock: growth at low temperatures and freezing/thawing challenge. *Lett Appl Microbiol* 23:398–402.
25. Flahaut S, Benachour A, Giard JC, Boutibonnes P, Auffray Y (1996) Defense against lethal treatments and de novo protein synthesis induced by NaCl in *Enterococcus faecalis* ATCC 19433. *Arch Microbiol* 165:317–324.

26. Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ (2012) Enterococci in the Environment. *Microbiol Mol Biol Rev* 76:685–706.
27. Van Tyne D, Gilmore MS (2014) Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Annu Rev Microbiol* 68:337–356.
28. Lebreton F, Manson AL, Saavedra JT, Straub TJ, Earl AM, Gilmore MS (2017) Tracing the Enterococci from Paleozoic Origins to the Hospital. *Cell* 169:849-861.e13.
29. Harwood VJ, Staley C, Badgley BD, Borges K, Korajkic A (2014) Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. *FEMS Microbiol Rev* 38:1–40.
30. Daillère R, Vétizou M, Waldschmitt N, Yamazaki T, Isnard C, Poirier-Colame V, Duong CPM, Flament C, Lepage P, Roberti MP, Routy B, Jacquelot N, Apetoh L, Becharaf S, Rusakiewicz S, Langella P, Sokol H, Kroemer G, Enot D, Roux A, Eggermont A, Tartour E, Johannes L, Woerther P-L, Chachaty E, Soria J-C, Golden E, Formenti S, Plebanski M, Madondo M, Rosenstiel P, Raoult D, Cattoir V, Boneca IG, Chamillard M, Zitvogel L (2016) *Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* facilitate cyclophosphamide-induced therapeutic immunomodulatory effects. *Immunity* 45:931–943.
31. Banla LI, Salzman NH, Kristich CJ (2019) Colonization of the mammalian intestinal tract by enterococci. *Curr Opin Microbiol* 47:26–31.
32. García-Solache M, Rice LB (2019) The Enterococcus: a Model of Adaptability to Its Environment. *Clin Microbiol Rev* 32:e00058-18.
33. Arias CA, Murray BE (2012) The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology* 10:266–278.
34. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, Edwards JR, Sievert DM (2016) 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. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 37:1288–1301.
35. CCLIN-ARLIN (2012) Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France.
36. Montealegre MC, Roh JH, Rae M, Davlieva MG, Singh KV, Shamoo Y, Murray BE (2016) Differential Penicillin-Binding Protein 5 (PBP5) levels in the *Enterococcus faecium* Clades with different levels of ampicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02034-16.
37. Bender JK, Cattoir V, Hegstad K, Sadowy E, Coque TM, Westh H, Hammerum AM, Schaffer K, Burns K, Murchan S, Novais C, Freitas AR, Peixe L, Del Grosso M, Pantosti A, Werner G (2018) Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature. *Drug Resist Updat* 40:25–39.
38. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC (1988) Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1:57–58.

39. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P (1988) Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N Engl J Med 319:157–161.
40. Gao W, Howden BP, Stinear TP (2018) Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. Curr Opin Microbiol 41:76–82.
41. Goh HMS, Yong MHA, Chong KKL, Kline KA (2017) Model systems for the study of Enterococcal colonization and infection. Virulence 8:1525–1562.
42. Willems RJ, Top J, Van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, Grundmann H, Bonten MJ (2005) Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. Emerg infect dis 11:821–828
43. Galloway-Peña J, Roh JH, Latorre M, Qin X, Murray BE (2012) Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*. PLoS One 7:e30187.
44. Lebreton F, van Schaik W, Manson McGuire A, Godfrey P, Griggs A, Mazumdar V, Corander J, Cheng L, Saif S, Young S, Zeng Q, Wortman J, Birren B, Willems RJL, Earl AM, Gilmore MS (2013) Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. mBio 4:e00534-13-e00534-13.
45. Raven KE, Reuter S, Reynolds R, Brodrick HJ, Russell JE, Török ME, Parkhill J, Peacock SJ (2016) A decade of genomic history for healthcare-associated *Enterococcus faecium* in the United Kingdom and Ireland. Genome Res 26:1388–1396.
46. Fleurette J, Freney J, Everdy ME (1995) Antiseptie et désinfection., ESKA, 1995: 155-168.
47. Hugo WB, Denyer SP (1987) The concentration exponent of disinfectants and preservatives (biocides) in: Preservatives in the Food, Pharmaceutical and Environmental Industries, Blackwell Scientific Publication. Oxford
48. Maillard J-Y (2002) Bacterial target sites for biocide action. J Appl Microbiol 92 Suppl:16S-27S
49. Broadley SJ, Jenkins PA, Furr JR, Russell AD (1995) Potentiation of the effects of chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride on mycobacteria by ethambutol. J Med Microbiol 43:458–460.
50. McDonnell G, Russell AD (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clinical microbiology reviews 12:147–179
51. Thomas L, Russell AD, Maillard J-Y (2005) Antimicrobial activity of chlorhexidine diacetate and benzalkonium chloride against *Pseudomonas aeruginosa* and its response to biocide residues. J Appl Microbiol 98:533–543.
52. Casey A, Itrakjy A, Birkett C, Clethro A, Bonser R, Graham T, Mascaro J, Pagano D, Rooney S, Wilson I, Nightingale P, Crosby C, Elliott T (2015) A comparison of the efficacy of 70% v/v isopropyl alcohol with either 0.5% w/v or 2% w/v chlorhexidine gluconate for skin preparation before harvest of the long saphenous vein used in coronary artery bypass grafting. Am J Infect Control 43:816–820.

53. So BKL, Chu CCY, Ho PL, Chow KH, Leung JNS, Lee IYM, Lin CK, Lee CK (2014) Evaluation of two chlorhexidine-alcohol-based skin disinfectants in blood donation setting. *Vox Sang* 106:316–321
54. Rackur H (1985) New aspects of mechanism of action of povidone-iodine. *J Hosp Infect* 6 Suppl A:13–23.
55. Sheldon AT (2005) Antiseptic “resistance”: real or perceived threat? *Clinical infectious diseases* 40:1650–1656
56. Lorian V (2005) *Antibiotics in laboratory medicine*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
57. Lepelletier D, Maillard JY, Pozzetto B, Simon A (2020) Povidone Iodine: properties, mechanisms of action, and role in infection control and *Staphylococcus aureus* Decolonization. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e00682-20.
58. Hugo, Denyer, Hodges (2004) *Pharmaceutical microbiology*, 7th ed. Blackwell Science, Malden, Mass
59. Regös J, Zak O, Solf R, Vischer WA, Weirich EG (1979) Antimicrobial spectrum of triclosan, a broad-spectrum antimicrobial agent for topical application. II. Comparison with some other antimicrobial agents. *Dermatologica* 158:72–79
60. McMurry LM, Oethinger M, Levy SB (1998) Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* 394:531–532.
61. Heath RJ, Li J, Roland GE, Rock CO (2000) Inhibition of the *Staphylococcus aureus* NADPH-dependent enoyl-acyl carrier protein reductase by triclosan and hexachlorophene. *J Biol Chem* 275:4654–4659.
62. McMurry LM, McDermott PF, Levy SB (1999) Genetic evidence that InhA of *Mycobacterium smegmatis* is a target for triclosan. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43:711–713
63. Dhillon G, Kaur S, Pulicharla R, Brar S, Cledón M, Verma M, Surampalli R (2015) Triclosan: current status, occurrence, environmental risks and bioaccumulation potential. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12:5657–5684.
64. Maillard J-Y, Bloomfield S, Coelho JR, Collier P, Cookson B, Fanning S, Hill A, Hartemann P, McBain AJ, Oggioni M, Sattar S, Schweizer HP, Threlfall J (2013) Does microbicide use in consumer products promote antimicrobial resistance? A critical review and recommendations for a cohesive approach to risk assessment. *Microb Drug Resist* 19:344–354.
65. Poole K (2002) Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol* 92 Suppl:55S-64S
66. Webber MA, Coldham NG, Woodward MJ, Piddock LJV (2008) Proteomic analysis of triclosan resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Antimicrob Chemother* 62:92–97.
67. Noguchi N, Hase M, Kitta M, Sasatsu M, Deguchi K, Kono M (1999) Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 172:247–253

68. Vali L, Davies SE, Lai LLG, Dave J, Amyes SGB (2008) Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J Antimicrob Chemother* 61:524–532.
69. Zhang M, O'Donoghue MM, Ito T, Hiramatsu K, Boost MV (2011) Prevalence of antiseptic-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci colonising nurses and the general population in Hong Kong. *J Hosp Infect* 78:113–117.
70. Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA (1996) Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev* 60:575–608.
71. Russell, Hugo, Ayliffe's (2013) *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, 5th ed
72. Kaatz GW, Seo SM, O'Brien L, Wahiduzzaman M, Foster TJ (2000) Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1404–1406
73. Huang J, O'Toole PW, Shen W, Amrine-Madsen H, Jiang X, Lobo N, Palmer LM, Voelker L, Fan F, Gwynn MN, McDevitt D (2004) Novel chromosomally encoded multidrug efflux transporter MdeA in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:909–917.
74. Kaatz GW, McAleese F, Seo SM (2005) Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel Multidrug and Toxin Extrusion (MATE) transport protein. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1857–1864.
75. Narui K, Noguchi N, Wakasugi K, Sasatsu M (2002) Cloning and characterization of a novel chromosomal drug efflux gene in *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull* 25:1533–1536.
76. Rouch DA, Cram DS, DiBerardino D, Littlejohn TG, Skurray RA (1990) Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline- and sugar-transport proteins. *Mol Microbiol* 4:2051–2062.
77. Heir E, Sundheim G, Holck AL (1999) The *qacG* gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. *J Appl Microbiol* 86:378–388.
78. Heir E, Sundheim G, Holck AL (1998) The *Staphylococcus qacH* gene product: a new member of the SMR family encoding multidrug resistance. *FEMS Microbiol Lett* 163:49–56.
79. Bjorland J, Steinum T, Sunde M, Waage S, Heir E (2003) Novel plasmid-borne gene *qacJ* mediates resistance to quaternary ammonium compounds in equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, and *Staphylococcus intermedius*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3046–3052.
80. Littlejohn TG, DiBerardino D, Messerotti LJ, Spiers SJ, Skurray RA (1991) Structure and evolution of a family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *Gene* 101:59–66.

81. Lavilla Lerma L, Benomar N, Valenzuela AS, Casado Muñoz M del C, Gálvez A, Abriouel H (2014) Role of EfrAB efflux pump in biocide tolerance and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from traditional fermented foods and the effect of EDTA as EfrAB inhibitor. *Food Microbiol* 44:249–257.
82. Berkelman RL, Anderson RL, Davis BJ, Highsmith AK, Petersen NJ, Bond WW, Cook EH, Mackel DC, Favero MS, Martone WJ (1984) Intrinsic bacterial contamination of a commercial iodophor solution: investigation of the implicated manufacturing plant. *Applied and environmental microbiology* 47:752–756
83. Nakashima AK, McCarthy MA, Martone WJ, Anderson RL (1987) Epidemic septic arthritis caused by *Serratia marcescens* and associated with a benzalkonium chloride antiseptic. *Journal of Clinical Microbiology* 25:1014–1018
84. Chuanchuen R, Beinlich K, Hoang TT, Becher A, Karkhoff-Schweizer RR, Schweizer HP (2001) Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:428–432.
85. Sidhu MS, Heir E, Leegaard T, Wiger K, Holck A (2002) Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with beta-lactamase transposon *Tn552* among clinical staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2797–2803
86. Bischoff M, Bauer J, Preikschat P, Schwaiger K, Mölle G, Hölzel C (2012) First detection of the antiseptic resistance gene *qacA/B* in *Enterococcus faecalis*. *Microb Drug Resist* 18:7–12.
87. Rizzotti L, Rossi F, Torriani S (2016) Biocide and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from the swine meat chain. *Food Microbiol* 60:160–164.
88. Russell AD (1996) Activity of biocides against mycobacteria. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 25:87S–101S
89. Cech TR, Steitz JA (2014) The noncoding RNA revolution—trashing old rules to forge new ones. *Cell* 157:77–94.
90. Felden B, Augagneur Y (2021) Diversity and Versatility in Small RNA-mediated regulation in bacterial pathogens. *Front Microbiol* 12:719977.
91. Waters LS, Storz G (2009) Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell* 136:615–628.
92. Svensson SL, Sharma CM (2016) Small RNAs in Bacterial Virulence and Communication. *Microbiol Spectr* 4
93. Sassi M, Augagneur Y, Mauro T, Ivain L, Chabelskaya S, Hallier M, Sallou O, Felden B (2015) SRD: a *Staphylococcus* regulatory RNA database. *RNA* 21:1005–1017.
94. Liu W, Rochat T, Toffano-Nioche C, Le Lam TN, Bouloc P, Morvan C (2018) Assessment of bona fide sRNAs in *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* 9

95. Chabelskaya S, Gaillot O, Felden B (2010) A *Staphylococcus aureus* small RNA is required for bacterial virulence and regulates the expression of an immune-evasion molecule. *PLoS Pathog* 6:e1000927.
96. Janzon L, Löfdahl S, Arvidson S (1989) Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, *hld*, adjacent to the accessory gene regulator (*agr*) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* 219:480–485.
97. Bronesky D, Wu Z, Marzi S, Walter P, Geissmann T, Moreau K, Vandenesch F, Caldelari I, Romby P (2016) *Staphylococcus aureus* RNAIII and its regulon link quorum sensing, stress responses, metabolic adaptation, and regulation of virulence gene expression. *Annu Rev Microbiol* 70:299–316.
98. Le KY, Otto M (2015) Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview. *Front Microbiol* 6:1174.
99. Le Huyen KB, Gonzalez CD, Pascreau G, Bordeau V, Cattoir V, Liu W, Bouloc P, Felden B, Chabelskaya S (2021) A small regulatory RNA alters *Staphylococcus aureus* virulence by titrating RNAIII activity. *Nucleic Acids Res* 49:10644–10656.
100. Smith EJ, Visai L, Kerrigan SW, Speziale P, Foster TJ (2011) The Sbi protein is a multifunctional immune evasion factor of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 79:3801–3809.
101. Le Pabic H, Germain-Amiot N, Bordeau V, Felden B (2015) A bacterial regulatory RNA attenuates virulence, spread and human host cell phagocytosis. *Nucleic Acids Res* 43:9232–9248.
102. Mauro T, Rouillon A, Felden B (2016) Insights into the regulation of small RNA expression: SarA represses the expression of two sRNAs in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res* 44:10186–10200.
103. Ménard G, Rouillon A, Ghukasyan G, Emily M, Felden B, Donnio P-Y (2021) *Galleria mellonella* larvae as an infection model to investigate sRNA mediated pathogenesis in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol* 11:631710.
104. Bordeau V, Cady A, Revest M, Rostan O, Sassi M, Tattevin P, Donnio P-Y, Felden B (2016) *Staphylococcus aureus* regulatory RNAs as potential biomarkers for bloodstream infections. *Emerging Infect Dis* 22:1570–1578.
105. Eyraud A, Tattevin P, Chabelskaya S, Felden B (2014) A small RNA controls a protein regulator involved in antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Research* 42:4892–4905.
106. Ivain L, Bordeau V, Eyraud A, Hallier M, Dreano S, Tattevin P, Felden B, Chabelskaya S (2017) An in vivo reporter assay for sRNA-directed gene control in Gram-positive bacteria: identifying a novel sRNA target in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res* 45:4994–5007.
107. Amdahl H, Jongerius I, Meri T, Pasanen T, Hyvärinen S, Haapasalo K, van Strijp JA, Rooijackers SH, Jokiranta TS (2013) Staphylococcal Ecb protein and host complement regulator factor H enhance functions of each other in bacterial immune evasion. *J Immunol* 191:1775–1784.

108. Riffaud C, Pinel-Marie M-L, Pascreau G, Felden B (2019) Functionality and cross-regulation of the four SprG/SprF type I toxin-antitoxin systems in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res* 47:1740–1758.
109. Pinel-Marie M-L, Brielle R, Riffaud C, Germain-Amiot N, Polacek N, Felden B (2021) RNA antitoxin SprF1 binds ribosomes to attenuate translation and promote persister cell formation in *Staphylococcus aureus*. *Nat Microbiol* 6:209–220.
110. Sinel C, Augagneur Y, Sassi M, Bronsard J, Cacaci M, Guérin F, Sanguinetti M, Meignen P, Cattoir V, Felden B (2017) Small RNAs in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* involved in daptomycin response and resistance. *Sci Rep* 7:11067.
111. Michaux C, Hansen EE, Jenniches L, Gerovac M, Barquist L, Vogel J (2020) Single-nucleotide RNA maps for the two major nosocomial pathogens *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Front Cell Infect Microbiol* 10:600325.
112. Le Neindre K (2021) Thèse de doctorat : Etude fonctionnelle de nouveaux ARN régulateurs exprimés chez *Enterococcus faecium*
113. Reissier S (2021) Thèse de Doctorat : Rôle des sARN dans la pathogénie d'*Enterococcus faecium*
114. Novick RP, Iordanescu S, Projan SJ, Kornblum J, Edelman I (1989) pT181 plasmid replication is regulated by a countertranscript-driven transcriptional attenuator. *Cell* 59:395–404.
115. Lam MMC, Seemann T, Bulach DM, Gladman SL, Chen H, Haring V, Moore RJ, Ballard S, Grayson ML, Johnson PDR, Howden BP, Stinear TP (2012) Comparative analysis of the first complete *Enterococcus faecium* genome. *Journal of Bacteriology* 194:2334–2341.
116. Herbert S, Ziebandt A-K, Ohlsen K, Schäfer T, Hecker M, Albrecht D, Novick R, Götz F (2010) Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infect Immun* 78:2877–2889.
117. Sassi M, Felden B, Augagneur Y (2014) Draft genome sequence of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* strain HG003, an NCTC8325 derivative. *Genome Announcements* 2:e00855-14-e00855-14.
118. Reissier S, Le Neindre K, Bordeau V, Dejoies L, Le Bot A, Felden B, Cattoir V, Revest M (2021) The regulatory RNA Ern0160 confers a potential selective advantage to *Enterococcus faecium* for intestinal colonization. *Front Microbiol* 12:757227.
119. European Commission. Directorate-General for Health and Consumers (2010) Opinion on triclosan: antimicrobial resistance. European Commission, BE
120. Koburger T, Hübner N-O, Braun M, Siebert J, Kramer A (2010) Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. *J Antimicrob Chemother* 65:1712–1719.
121. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 3:163–175.

122. Zhang Y-F, Han K, Chandler CE, Tjaden B, Ernst RK, Lory S (2017) Probing the sRNA regulatory landscape of *P. aeruginosa*: post-transcriptional control of determinants of pathogenicity and antibiotic susceptibility. *Mol Microbiol* 106:919–937.
123. Bhardwaj P, Ziegler E, Palmer KL (2016) Chlorhexidine induces vanA-type vancomycin resistance genes in Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 60:2209–2221.
124. Dejoies L, Le Neindre K, Reissier S, Felden B, Cattoir V (2021) Distinct expression profiles of regulatory RNAs in the response to biocides in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium*. *Sci Rep* 11:6892.
125. Möller S, Croning MD, Apweiler R (2001) Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* 17:646–653.
126. Zhang X, Vrijenhoek JEP, Bonten MJM, Willems RJL, van Schaik W (2011) A genetic element present on megaplasmids allows *Enterococcus faecium* to use raffinose as carbon source. *Environmental Microbiology* 13:518–528.
127. Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8:67–113.
128. Neyfakh AA, Bidnenko VE, Chen LB (1991) Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4781–4785
129. Sinel C, Cacaci M, Meignen P, Guérin F, Davies BW, Sanguinetti M, Giard J-C, Cattoir V (2017) Subinhibitory concentrations of ciprofloxacin enhance antimicrobial resistance and pathogenicity of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02763-16.
130. Urban JH, Vogel J (2009) A green fluorescent protein (GFP)-based plasmid system to study post-transcriptional control of gene expression *in vivo*. *Methods Mol Biol* 540:301–319.
131. Buist G, Steen A, Kok J, Kuipers OP (2008) LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Mol Microbiol* 68:838–847.
132. Liao X, Yang F, Li H, So P-K, Yao Z, Xia W, Sun H (2017) Targeting the thioredoxin reductase-thioredoxin system from *Staphylococcus aureus* by silver ions. *Inorg Chem* 56:14823–14830.
133. Baseri N, Najar-Peerayeh S, Bakhshi B, Campanile F (2022) Phenotypic and genotypic changes of *Staphylococcus aureus* in the presence of the inappropriate concentration of chlorhexidine gluconate. *BMC Microbiol* 22(1):100.

ANNEXES

Annexe 1 : Amorces pour études complémentaires

Nom	Séquence	Utilisation
<i>vanB</i> F	CATCGCCGTTCCCGAATTC	RT-qPCR
<i>vanB</i> R	CGCAGCGTTAAGTTCTTCCG	RT-qPCR
<i>clpX</i> F	GTGATTGGACAAGATCGCGC	RT-qPCR
<i>clpX</i> R	CCCTGTAGGTCCGATCAAGC	RT-qPCR
EFAU004_02580 F	GCTTGGGTCACTCCAATTGC	RT-qPCR
EFAU004_02580 R	AGCAGTCACGACACCGATT	RT-qPCR
EFAU004_02581 F	GATATTACCAAGCTTTCACGTGGAG	RT-qPCR
EFAU004_02581 R	ATTTGTTCTCTTGTGGCATCCATT	RT-qPCR
EFAU004_00722 F	CCTATTGCCCTAGCAGTTG	RT-qPCR
EFAU004_00722 R	TCGAGTCCAAAGAGCCAGTT	RT-qPCR
<i>ddcP</i> F	TCTGCAATCATCCAGTCAGC	RT-qPCR
<i>ddcP</i> R	GTCGGTTTTCGCCAAGATAA	RT-qPCR
EFAU004_02580-81 KO F1	TGGTTCGAATTCGATTTCAATAAGAATCGACGAT	Délétion
EFAU004_02580-81 KO R1	AGCTTTTGTAGATAATGTTTGTATTCCTCCTTTTTCTGA	Délétion
EFAU004_02580-81 KO F2	CAAACATTATCTAAAAAGCTATCGATCATGTATGATTAGT	Délétion
EFAU004_02580-81 KO R2	TACAAAGAATTCGCTTCGTTACAACCTTCTTTAGG	Délétion
EFAU004_02580-81 KO VF	GCGGATCGTTGATTTGGCA	Délétion
EFAU004_02580-81 KO VR	AGGTTGTCTCTTGAACACCGT	Délétion
<i>plCS3-pstI-ami-for</i>	TTAAAAGCTTGCATGCCTGCAGGAAAATTTGTTTGATTTTAATG	Clonage
<i>ern0160-ami-rev</i>	GATGGTATCCTCCTTCCCTACCCATTATATCACATTATCCA	Clonage
<i>PamiA</i> for	GAAAATTTGTTTGATTTTAATGGATAATGTGATATAATGG	Clonage
<i>Pami-ern0160-for</i>	TGGATAATGTGATATAATGGGTAAGGAAGGAGGATACCATC	Clonage

pICS3-Narl- <i>erm0160</i> -rev	GAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATAACAAAAAAGCTTTACAAAG	Clonage
pCN33-Efmqnr- <i>gfp</i> for	GAAACTATCATGAGAGAAGATCTGTTAATATGACTTTATGAAAATG	Clonage
pCN33- Efmqnr- <i>gfp</i> rev	AGTTCTTCTCCTTTGCTTCTAGAGATATCATTAAGCGTACAATTTTTTAGA	Clonage
pCN33-1059-1150- <i>gfp</i> for	GAAACTATCATGAGAGAAGATCTGTATTCCTCGTTGAACACAAC	Clonage
pCN33-1059-1150- <i>gfp</i> rev	AAGTTCTTCTCCTTTGCTTCTAGAGATATCAACGGTATAAGCTTCGTCCGC	Clonage
T7 EFAU004_02176 F	TAATACGACTCACTATAGGGATGAAACAAACCACTAACTT	EMSA
T7 EFAU004_02176 R	TTATTTTGTTTCGGAAGATTTCTTCATAAGAAAGGGAATCA	EMSA

Introduction

There are currently some evidences for a link between heavy usage of biocides and emergence of antibiotic resistance. However, mechanisms of cross-/co-resistance selection are poorly understood, especially at sub-lethal concentrations that can be found in clinical practice. The aim of the study was to determine the biocide stress response in the major ESKAPE Gram-positive pathogens, *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus*.

Materials and methods

Four clinically-relevant biocides were studied: chlorhexidine (CH), benzalkonium chloride (BC), PVP-Iodine (PVP-I) and triclosan (TRI). The *in vitro* activities were evaluated against *S. aureus* HG003 and *E. faecium* Aus0004.

- Minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC) values were determined using the broth microdilution method (BMD) after 48 h and 24 h of incubation, respectively.
- Growth curves in Brain-Heart Infusion (BHI) under sub-lethal conditions (concentrations of biocides ranging from 1 x MIC to 1/128 x MIC) were established using the spectrophotometer Synergy 2 (BioTek) during 12 h at 37° C without agitation and represented with the GraphPad Prism software.

Results

- MICs of CH and BC were two-fold higher against *E. faecium* than *S. aureus* (4 mg/L vs 2 mg/L) and MICs of TRI were four-fold higher (8 mg/L vs 2 mg/L). These results suggest a reduced susceptibility of *E. faecium* to biocides as compared to *S. aureus*. By contrast, MICs of PVP-I were identical for both species and 1,000-fold higher than the other biocides (2,048 mg/L).

MIC_{24h} and MBC_{24h} values determined by BMD assays

	<i>S. aureus</i> HG003			<i>E. faecium</i> Aus0004		
	MIC 48 h (mg/L)	MBC 24 h (mg/L)	CMB/CMI	MIC 48 h (mg/L)	MBC 24 h (mg/L)	CMB/CMI
Chlorhexidine	2	4	2	4	4	1
Benzalkonium chloride	2	8	4	4	8	2
Triclosan	2	8	4	8	16	2
PVP-Iodine	2,048	2,048	1	2,048	2,048	1

- Growth curves in the presence of increasing biocidal concentrations highlighted two types of bactericidal activity:
 - CH, BC and PVP-I revealed an “on/off” effect on the growth of bacteria (Figure 1A-C, Figure 2A-C).
 - TRI acted with a “dose-effect” activity resulting in gradual inhibition of the bacterial growth while biocide concentrations increased (Figure 1D, Figure 2D).

Figure 1 : Growth curves of *E. faecium* under biocide conditions

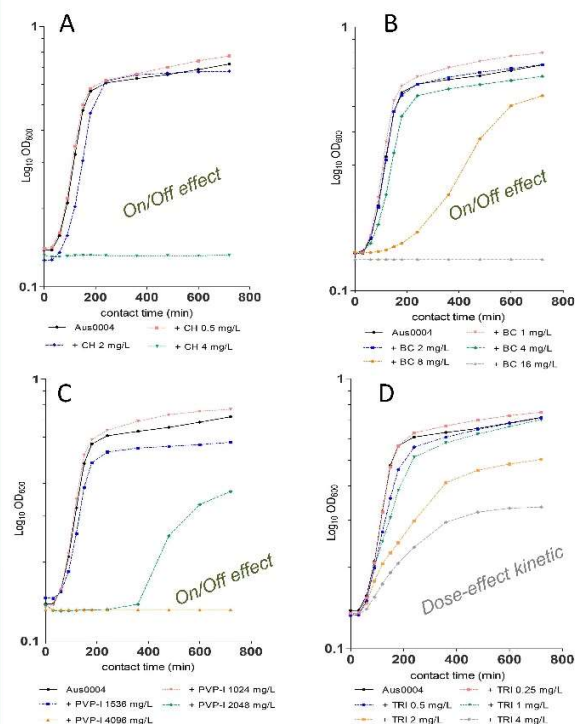
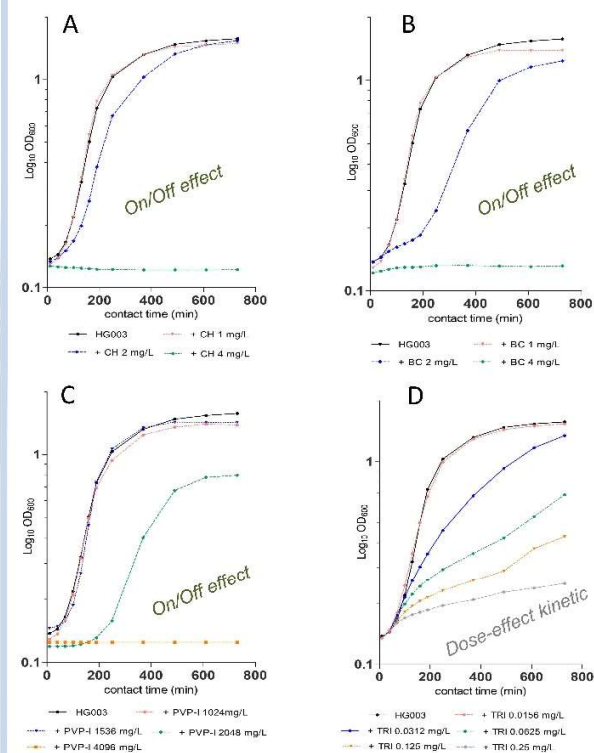


Figure 2 : Growth curves of *S. aureus* under biocide conditions



Conclusions

Based on analysis of growth curves under sub-lethal conditions, TRI likely acts similarly to antibiotics, i.e. by binding to a specific molecular target. Indeed, it was demonstrated that FabI (involved in fatty acid biosynthesis) was the main target of TRI. Then, TRI may be more at risk to select resistance strains than “on-off” biocides (CH, BC, PVP-I) when a biocidal pressure occurs in the environment.

Annexe 3 : Performances du séquençage RNA-seq

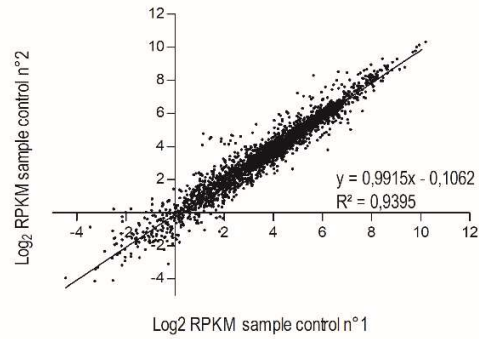
Parameter	Control		delta_0160		WT + Chlorhexidine		WT + Benzalkonium chloride		delta_0160OpAT29vide		delta_0160OpAT29_0160	
	Sample 1	Sample 2	Sample 1	Sample 2	Sample 1	Sample 2	Sample 1	Sample 2	Sample 1	Sample 2	Sample 1	Sample 2
Total number of raw reads	25451230	30224263	20354627	32726443	24083	25506282	23555098	25425813	15296832	24533475	27327534	22310331
					406							
Number of mapped reads	22535523	27599878	17231487	27408052	20309127	22934809	20633037	22101988	12851393	17728375	21288868	17131860
Percentage of mapped reads (%)	89	91	85	84	84	90	88	87	84	72	78	77
Average size of mapped reads (nt)	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75
Average coverage of the genome ^a (X)	572	700	437	696	515	582	524	561	326	450	540	435
Number of reads mapped to rRNA genes	1169244	998506	1462363	2502410	1781584	796505	1297969	1328858	317623	1825890	854373	734190
Percentage of mapped to rRNA genes (%)	5	4	8	9	9	3	6	6	2	10	4	4
Number of reads mapped to CDSs	16867815	21163054	12719115	21275432	15199078	16716099	15960235	15807928	9981645	13793179	16219823	12888095
Percentage of reads mapped to CDSs (%)	75	77	74	78	75	73	77	72	78	78	76	75
Average number of reads per CDS ^b	5765	7233	4347	7271	5194	5713	5455	5403	3411	4714	5543	4405

^a The genome size of Aus0004 is 2,955,294 bp.

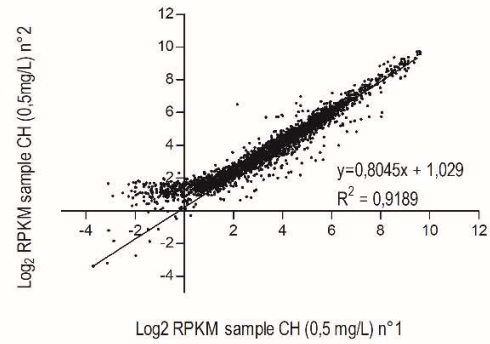
^b The number of predicted CDSs is 2,926.

Annexe 4 : Reproductibilité entre duplicats de séquençage RNA-seq pour les conditions : **A** : Aus0004 contrôle sans antiseptique ; **B** : Aus0004 + chlorhexidine (0,5 mg/L) ; **C** : Aus0004 + chlorure de benzalkonium (1,0 mg/L) et les souches isogéniques délétée (**D**) et complémentées (**E** et **F**) de l'Ern0160.

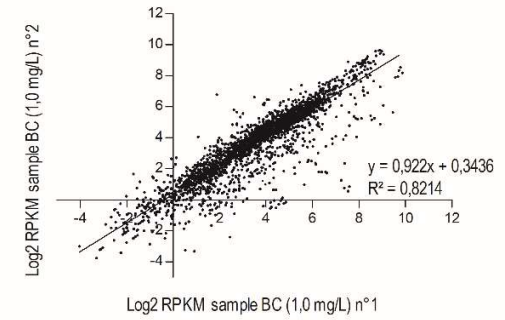
A



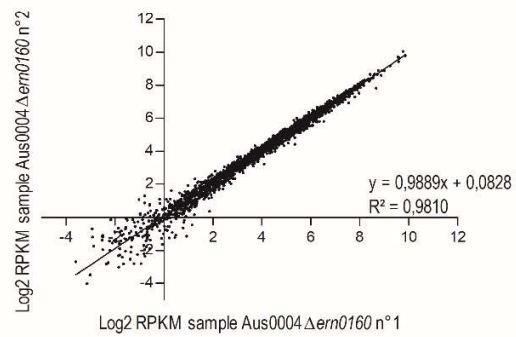
B



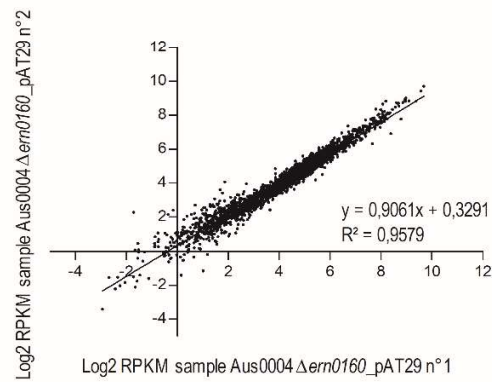
C



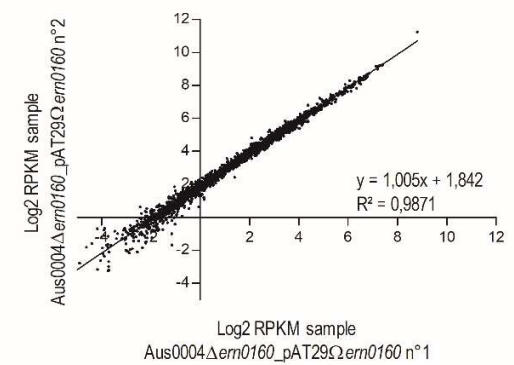
D



E



F



Annexe 5 : Gènes dont l'expression est augmentée en présence de chlorhexidine (0,5 mg/L) par rapport au contrôle sans antiseptique (RNA-seq)

Gene ID	Name	Product	Expression + CH	Expression - CH	Fold Change	Adjusted P-value
Amino acid biosynthesis and metabolism						
EFAU004_00692	<i>glnA</i>	glutamine synthetase, type I	183,8465771	9,008637123	20,40781248	0,000144446
Cell wall / LPS / capsule						
EFAU004_00901		Na dependent nucleoside transporter, NupC family	56,40083923	16,16929359	3,488144915	0,039495106
Hypothetical, unclassified, unknown						
EFAU004_02433		Substrate binding domain of ABC-type glycine betaine transport system	104,2197238	27,91155736	3,733927221	0,007233762
Membrane proteins						
EFAU004_00162		glycerol uptake facilitator protein	509,6014026	124,2859489	4,10023343	0,001747988
Nucleotide biosynthesis and metabolism						
EFAU004_00694	<i>pyrG</i>	CTP synthase	88,02289681	30,48634664	2,887289115	0,046553112
EFAU004_00962	<i>pyrE</i>	orotate phosphoribosyltransferase	57,97678818	7,809266572	7,424101566	9,85742E-06
EFAU004_00963		Orotidine 5'-phosphate decarboxylase	120,7995521	16,10101405	7,502605222	4,3767E-07
EFAU004_00964	<i>pyrDB</i>	Dihydroorotate dehydrogenase 1B	106,1933472	12,54471285	8,465187566	2,1938E-07
EFAU004_00965		dihydroorotate dehydrogenase, electron transfer subunit	103,5562113	12,31133443	8,411453031	2,78896E-07
EFAU004_00966	<i>carB</i>	carbamoyl-phosphate synthase large subunit	99,40948475	11,4124983	8,710580462	2,1938E-07
EFAU004_00967	<i>carA</i>	carbamoyl-phosphate synthase small subunit	51,11126622	6,680729014	7,650552225	1,61904E-05
EFAU004_00968	<i>pyrC</i>	Dihydroorotase	38,26559262	5,953051138	6,427895836	0,00040393
EFAU004_00969	<i>pyrB</i>	aspartate carbamoyltransferase	62,90923712	9,952731496	6,320801194	0,000182538
EFAU004_00970		uracil permease	63,24686076	11,87828428	5,324578809	0,000732576
EFAU004_00971	<i>pyrR</i>	pyrimidine operon regulatory protein/uracil phosphoribosyltransferase	29,5183639	5,82308847	5,069193787	0,007233762
Transcriptional regulators						
EFAU004_00691		MerR family transcriptional regulator	376,4182518	12,27732646	30,65962716	0,005515287
Translation, post-translational modification, degradation						
EFAU004_00009	<i>rpsR</i>	30S ribosomal protein S18	94,9613543	27,11786115	3,501801038	0,00892444
EFAU004_00098	<i>rplB</i>	50S ribosomal protein L2	7023,672687	2263,619374	3,102850579	0,033130293
EFAU004_00170	<i>rpsD</i>	30S ribosomal protein S4	1933,656817	651,58372	2,967626044	0,030499605
EFAU004_00264	<i>infC</i>	translation initiation factor IF-3	2101,441094	692,0641219	3,036483221	0,032125149
EFAU004_00265	<i>rpmI</i>	50S ribosomal protein L35	2416,13115	718,5829387	3,362355297	0,010609604
EFAU004_00266	<i>rplT</i>	50S ribosomal protein L20	162,2780319	55,62779764	2,917211158	0,03326019
EFAU004_00741	<i>rpmA</i>	50S ribosomal protein L27	161,6993473	49,53846513	3,264117022	0,00995032
Transport of small molecules						
EFAU004_00497		major facilitator superfamily transporter	45,90160922	4,543164159	10,103445	6,42134E-06
EFAU004_01693		amino acid ABC transporter amino acid-binding/permease	460,1646869	32,53143342	14,14523243	6,69379E-05
EFAU004_01694	<i>artM</i>	amino acid ABC transporter ATP-binding protein	225,3251788	12,09118596	18,63549031	4,88419E-06
EFAU004_02434		glycine betaine transporter ATP-binding subunit	85,17663571	26,22850709	3,247483184	0,034442538
EFAU004_02581		ABC transporter ATP-binding protein	25,73156271	6,120915402	4,203874914	0,045822276
EFAU004_02588		ABC transporter ATP-binding protein	179,3088748	59,10678208	3,033642985	0,010189567
EFAU004_02589		ABC transporter ATP-binding protein	105,6488379	34,03102297	3,104486103	0,014106477

Annexe 6 : Gènes dont l'expression est diminuée en présence de chlorhexidine (0,5 mg/L) par rapport au contrôle sans antiseptique (RNA-seq).

Gene ID	Name	Product	Expression + CH	Expression - CH	Fold Change	Adjusted P-value
Amino acid biosynthesis and metabolism						
EFAU004_01734	<i>arcC</i>	Carbamate kinase	897,0445499	3223,066006	-3,59298321	0,004553641
EFAU004_01735	<i>arcB</i>	ornithine carbamoyltransferase	5732,705612	18084,03348	-3,154537265	0,048320972
Carbon compound catabolism						
EFAU004_00039		6-phospho-beta-galactosidase	71,51611349	734,4485319	-10,26969303	0,035945695
EFAU004_00368		6-phospho-beta-glucosidase	35,89190639	233,6097084	-6,508701595	0,000744038
EFAU004_00394		dihydroxyacetone kinase, DhaL subunit	55,16299335	164,9787025	-2,99074964	0,045822276
EFAU004_00447		glucan 1,6-alpha-glucosidase	597,3073334	2097,990031	-3,512412981	0,04311713
EFAU004_00602		6-phospho-beta-glucosidase	28,47152044	94,86900178	-3,332066582	0,037179897
EFAU004_01583		Beta-galactosidase small subunit	22,70060736	609,3008438	-26,84072872	1,89482E-14
EFAU004_01584		Beta-galactosidase large subunit	43,66891362	1444,168087	-33,07084989	1,25966E-16
EFAU004_01585		alpha-galactosidase	24,01299991	660,6654805	-27,51282567	1,25966E-16
EFAU004_02707		sugar isomerase	2768,575478	10711,95483	-3,869121474	0,001123292
Central intermediary metabolism						
EFAU004_00378	<i>glpO</i>	alpha-glycerophosphate oxidase	135,9767271	1014,890484	-7,463707246	0,045398689
Hypothetical, unclassified, unknown						
EFAU004_01256		hypothetical protein	66,09760866	260,6887825	-3,943997185	3,80082E-05
EFAU004_01260		PRD domain-containing protein	20,77344679	70,23256732	-3,380881759	0,019119295
EFAU004_01344		chitin binding protein	32,27510331	161,7558151	-5,01178303	0,000151435
EFAU004_01493		HAD superfamily hydrolase	3,228089575	42,74942242	-13,24294801	0,000802285
EFAU004_01496		hypothetical protein	3,789392253	48,48699557	-12,79545435	0,002432186
EFAU004_01497		hypothetical protein	3,772280371	43,84041409	-11,62172738	0,010405486
EFAU004_02254		SIS domain-containing protein	8,13329394	25,61123123	-3,148937124	0,037179897
EFAU004_02255		SIS domain-containing protein	10,05213891	49,2218312	-4,896652507	0,000369071
EFAU004_02298		alpha/beta hydrolase fold protein	75,78953486	174,0673895	-2,296720646	0,047752113
EFAU004_02571		hypothetical protein	6,589003716	62,09572786	-9,424145219	7,42479E-07
Membrane proteins						
EFAU004_00379		glycerol uptake facilitator protein	18,64207071	184,8922959	-9,918012796	0,00033045
EFAU004_00890		integral membrane protein	18,4566464	272,6391661	-14,77186918	2,1938E-07
Putative enzymes						
EFAU004_00042		Glycosyl hydrolase family 53	12,99549942	759,6393895	-58,45403591	2,54957E-16
EFAU004_00322		oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein	74,1962051	230,5843883	-3,107765255	0,048982468
EFAU004_00369		HTH domain protein	41,23532722	130,1775055	-3,156941251	0,008774633
EFAU004_00406		aldose 1-epimerase	400,6107502	2037,216307	-5,085276185	0,019750278
EFAU004_00701		fructose-1,6-bisphosphate aldolase	25,25845173	65,04286028	-2,575092923	0,030541687
EFAU004_00886		alpha amylase	47,29739555	522,8055322	-11,05357972	0,000413083
EFAU004_01255		Class II Aldolase and Adducin N-terminal domain protein	18,40709768	68,51118015	-3,721997969	0,000723985
EFAU004_01494	<i>uxuA_1</i>	D-mannonate dehydratase	3,052330073	39,38580467	-12,90352082	0,00298022
EFAU004_02549		GDSL-like Lipase/Acylhydrolase	7,326257736	23,49591599	-3,207082912	0,043370992

Gene ID	Name	Product	Expression + CH	Expression - CH	Fold Change	Adjusted P-value
Transcription, RNA processing and degradation						
EFAU004_02260		transcriptional antiterminator bglG:Sigma-54 factor	19,15097521	74,24299626	-3,876721444	0,003664637
EFAU004_02573		transcriptional antiterminator bglG	40,72388274	337,5634993	-8,289079444	2,70894E-05
Transcriptional regulators						
EFAU004_00405		LacI family transcriptional regulator	358,8572236	1610,00419	-4,486475633	0,017503771
EFAU004_01742		LacI family transcriptional regulator	115,0500522	496,6601839	-4,316905332	0,025724532
Translation, post-translational modification, degradation						
EFAU004_00206		50S ribosomal protein L25	128,4444447	375,4056578	-2,922708403	0,00751065
Transport of small molecules						
EFAU004_00040		PTS system, lactose/cellobiose-specific IIA component	41,86761776	742,960129	-17,74545983	0,000744038
EFAU004_00041		PTS system, lactose/cellobiose-specific IICB component	23,77836561	663,798436	-27,91606652	4,3767E-07
EFAU004_00601		PTS system beta-glucoside-specific transporter subunit IIABC	17,59543357	81,00949575	-4,604006798	0,043718999
EFAU004_00888		ABC transporter permease	52,07989454	399,7179027	-7,675090478	0,01258856
EFAU004_00889		ABC transporter permease	23,20498937	308,5255787	-13,29565697	8,01187E-06
EFAU004_01257		PTS system galactitol-specific transporter subunit IIC	38,74422498	137,7864464	-3,556309269	0,000732576
EFAU004_01258		PTS system galactitol-specific transporter subunit IIB	23,99767821	98,77673476	-4,116095479	0,000294967
EFAU004_01495		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIA component	3,412076023	39,25553689	-11,50488343	0,004553641
EFAU004_01498		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIB component	6,861489817	63,56017837	-9,263320366	0,033238372
EFAU004_02256		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IID component	6,501896242	37,04064557	-5,696898904	0,000756844
EFAU004_02257		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIC component	3,502142673	22,69178498	-6,479400497	0,010070794
EFAU004_02258		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIB component	5,464116954	41,2323079	-7,546014892	0,000737423
EFAU004_02259		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIA component	7,862458725	41,77840538	-5,313656559	0,004194701
EFAU004_02570		PTS system cellobiose-specific transporter subunit IIC	8,847915536	45,98321492	-5,197067573	0,000294286
EFAU004_02572		PTS system, cellobiose-specific IIA component	11,37214871	118,7221398	-10,43972804	1,11503E-07
EFAU004_02574		PTS system cellobiose-specific transporter subunit IIB	38,40690093	267,3120875	-6,960001484	0,000294286
EFAU004_02703		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IID component	1797,405166	4908,301595	-2,730770829	0,035945695
EFAU004_02704		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIC component	9510,628061	31792,49159	-3,342838284	0,008421135
EFAU004_02705		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIB component	7318,726911	25735,52162	-3,51639321	0,005530528
EFAU004_02706		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIA component	6275,193693	22857,48192	-3,642514166	0,004194701

Résumé accepté pour communication affichée au titre de poster #6952 au congrès Microbes 2022 (SFM) ayant lieu au Corum de Montpellier du 3 au 5 octobre 2022.

Implication de l'ARN régulateur Ern0160 dans la régulation de la virulence de *Enterococcus faecium*

Loren Dejoies¹ (lorendejoies@hotmail.com), Valérie Bordeau¹, Svetlana Chabelskaya¹, Vincent Cattoir^{1,2}

¹ U1230, Université Rennes 1, Rennes, France

² Bactériologie - Hygiène Hospitalière, CHU de Rennes, Rennes, France

Introduction et objectifs

Malgré l'intérêt croissant de la communauté scientifique pour l'étude des réseaux de régulation médiés par les ARN régulateurs bactériens (sARN), peu de données concernent *Enterococcus faecium*. En 2017, les 9 tout premiers sARN de *E. faecium* ont été décrits chez Aus0004. Depuis, l'Ern0160 est le sARN le plus étudié et a été rapporté comme étant impliqué dans la réponse au stress antibiotique, antiseptique ainsi que dans la colonisation intestinale sur modèle murin. Ce travail avait pour objectifs de caractériser plus précisément les fonctions de Ern0160 et d'identifier ses cibles directes et indirectes.

Matériels et Méthodes

L'analyse *in silico* par CopraRNA et TargetRNA2 a permis la prédiction de cibles dont l'interaction directe ARN-ARN avec Ern 0160 a été testée par gel retard (Ern0160 radiomarqué). L'impact de Ern0160 sur l'expression des cibles a été vérifiée par qRT-PCR quantitative absolue en comparant les souches native/délétée et complémentées avec/sans Ern0160. Le cas échant, la régulation a été étudiée par un système à double plasmide avec le gène rapporteur *gfp*.

Résultats discussion conclusion

Les cibles à fonction clé ont été sélectionnées : synthèse de paroi (*ddcP*), protéine 'ABC transporter' (*ABC722*) et peptidase à domaine LysM nommée M23Efm. L'Ern0160 était responsable de l'induction de *ddcP* et de la répression de *ABC722* et de *M23Efm*. L'interaction directe avec Ern0160 a été trouvée uniquement pour M23Efm, au sein de la séquence codante du gène cible. La délétion d'une partie de cette séquence entraînait la perte de l'interaction. L'absence de retard sur gel avec *ddcP* et *ABC722* n'excluait pas une régulation indirecte de Ern0160. La mise au point du système rapporteur à double plasmide avec Ern0160 et M23Efm est encore en cours en raison d'une probable toxicité de M23Efm en système hétérologue chez *Escherichia coli*.

La peptidase M23Efm a récemment été décrite par une autre équipe comme facteur de virulence sur modèle murin d'infection systémique et d'infection urinaire. Nous avons mis en évidence la toute première cible directe d'un sARN de *E. faecium*. L'Ern0160 régule négativement l'expression d'un gène de virulence. L'impact de cette régulation reste à évaluer *in vivo* sur modèle animal (*Galleria mellonella*, souris).

Mots clés : virulence - ARN régulateur - Ern0160 - *Enterococcus faecium* - Peptidase M23.

Annexe 8 : Gènes dont l'expression est diminuée chez le mutant délété de *erm0160* par rapport à la souche native (RNA-seq)

Gene ID	Name	Product	Expression Aus0004	Expression Aus0004 Δ <i>erm0160</i>	Fold Change	Adjusted P-value
Amino acid biosynthesis and metabolism						
EFAU004_01501		iron-containing alcohol dehydrogenase	50,18574893	1,990700394	-25,21009645	1,55E-03
EFAU004_01502		iron-containing alcohol dehydrogenase	34,08992616	1,157063291	-29,46245589	2,71E-03
Carbon compound catabolism						
EFAU004_00325		beta-glucosidase	35,57201766	13,97623319	-2,545179176	3,12E-02
EFAU004_00407		beta-phosphoglucomutase	3258,174905	417,772399	-7,798923319	7,05E-05
EFAU004_01503		4-phosphoerythronate dehydrogenase	54,57804291	2,507206086	-21,76847097	2,25E-03
EFAU004_01504		6-phosphogluconate dehydrogenase	67,59263171	2,814216109	-24,01828043	7,58E-03
Central intermediary metabolism						
EFAU004_00377	<i>glpK</i>	glycerol kinase	1357,274246	399,8677182	-3,394308128	8,85E-03
EFAU004_00378	<i>glpO</i>	alpha-glycerophosphate oxidase	1014,890484	268,4061435	-3,781174567	2,25E-03
Energy metabolism						
EFAU004_01093		transketolase	3751,994737	1812,177545	-2,070434405	7,01E-03
hypothetical, unclassified, unknown						
EFAU004_00369		HTH domain protein	130,1775055	59,95533992	-2,171241222	5,43E-03
EFAU004_00376		helix-turn-helix domain-containing protein	465,9319995	175,5900895	-2,653521054	1,55E-03
EFAU004_00517		integral membrane protein	40,39375644	20,18775979	-2,000903362	3,84E-02
EFAU004_00600		hypothetical protein	130,7217946	13,69136374	-9,547755587	7,93E-04
EFAU004_00887		extracellular solute-binding protein	858,3910637	419,3244701	-2,047080781	2,36E-02
EFAU004_01496		hypothetical protein	48,48699557	6,770348381	-7,161669215	6,69E-03
EFAU004_01497		hypothetical protein	43,84041409	7,328069436	-5,982532572	2,58E-02
EFAU004_01659		hexose kinase, 1-phosphofructokinase family protein	1758,847571	842,1181554	-2,088599515	4,13E-02
EFAU004_01660		DeoR-like helix-turn-helix protein	3316,509439	1511,550025	-2,194111596	2,82E-02
EFAU004_01776		hypothetical protein	62,72810917	16,74181861	-3,746791829	4,95E-02
Membrane proteins						
EFAU004_00379		glycerol uptake facilitator protein	184,8922959	74,01581114	-2,498010804	1,74E-02
Putative enzyme						
EFAU004_00039		6-phospho-beta-galactosidase	734,4485319	158,5636214	-4,631885458	4,02E-03
EFAU004_00042		Glycosyl hydrolase family 53	759,6393895	247,1965805	-3,073017385	1,11E-03
EFAU004_00367		glucan 1,6-alpha-glucosidase	175,4931275	25,7998397	-6,802101466	9,87E-05
EFAU004_00368		6-phospho-beta-glucosidase	233,6097084	39,15397393	-5,966436735	1,12E-05
EFAU004_00394		dihydroxyacetone kinase, DhaL subunit	164,9787025	77,76613356	-2,121472355	6,69E-03
EFAU004_00406		aldose 1-epimerase	2037,216307	358,3770459	-5,68456136	2,38E-04
EFAU004_00408		glycoside hydrolase, family 65	3169,57267	330,8914076	-9,578890832	1,29E-04
EFAU004_00410		endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein	835,0614249	50,60283692	-16,502265	8,88E-05
EFAU004_00481		galactokinase	4585,291026	2127,540939	-2,155206954	3,06E-02
EFAU004_00482		aldose 1-epimerase	8692,154019	3171,550034	-2,74066432	5,53E-03
EFAU004_00602		6-phospho-beta-glucosidase	94,86900178	32,69708859	-2,901451042	9,59E-03
EFAU004_00612		putative 6-phospho-beta-glucosidase	107,3794846	50,461014	-2,12796922	5,56E-03
EFAU004_00886		alpha amylase	522,8055322	231,9899272	-2,253569965	4,02E-03
EFAU004_01101		sensor histidine kinase	17,99534966	4,869111252	-3,695818135	3,77E-02

Gene ID	Name	Product	Expression Aus0004	Expression Aus0004 Δ <i>ern0160</i>	Fold Change	Adjusted P-value
EFAU004_01481		glycosyl transferase family protein	198,2700206	92,09075172	-2,152985146	7,94E-04
EFAU004_01493		HAD superfamily hydrolase	42,74942242	10,74245327	-3,979484142	3,12E-02
EFAU004_01494	<i>UxuA_1</i>	D-mannonate dehydratase,	39,38580467	7,556072912	-5,212470171	1,64E-02
EFAU004_02122		L-lactate oxidase	198,9566604	86,4408841	-2,301649994	3,93E-02
EFAU004_02546		mannitol dehydrogenase protein	27,06572374	5,511674974	-4,910616803	4,02E-03
Transcription, RNA processing and degradation						
EFAU004_00599		BglG family transcriptional antiterminator	247,506348	59,36943842	-4,168918464	4,89E-03
Transcriptional regulators						
EFAU004_00405		Lacl family transcriptional regulator	1610,00419	370,7409919	-4,342665702	1,11E-03
EFAU004_01102		AraC family transcriptional regulator	27,49825154	5,880578225	-4,676113554	7,88E-03
Transport of small molecules						
EFAU004_00040		PTS system, lactose/cellobiose-specific IIA component	742,960129	178,8335329	-4,154478845	2,71E-03
EFAU004_00041		PTS system, lactose/cellobiose-specific IICB component	663,798436	173,6636309	-3,822322684	1,97E-03
EFAU004_00409		PTS system glucose-specific transporter subunit IIABC	2330,335727	125,2085095	-18,61164019	1,97E-04
EFAU004_00483		sodium/galactoside symporter	5861,071842	2500,398076	-2,344055492	2,56E-02
EFAU004_00515		ABC transporter ATP-binding protein	78,12242141	36,11991872	-2,162862603	1,74E-02
EFAU004_00516		ABC transporter permease	59,88719615	28,30991227	-2,115414402	1,56E-02
EFAU004_00601		PTS system beta-glucoside-specific transporter subunit IIABC	81,00949575	15,61755951	-5,18707777	3,83E-03
EFAU004_00700	<i>BepA</i>	PTS system fructose-specific transporter subunit IIBC	25,66181666	8,324561171	-3,082662994	8,83E-03
EFAU004_00744		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIB component	3601,334073	1629,606896	-2,209940374	2,82E-02
EFAU004_00745		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIC component	4227,725312	1687,168742	-2,505810597	1,23E-02
EFAU004_00746		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IID component	497,143921	208,2641764	-2,387083221	1,20E-02
EFAU004_00888		ABC transporter permease	399,7179027	129,284352	-3,091773262	2,37E-03
EFAU004_00889		ABC transporter permease	308,5255787	127,6502005	-2,416961175	8,05E-03
EFAU004_00937		PTS system ascorbate-specific transporter subunit IIA	212,4023769	96,97497918	-2,190280201	3,04E-03
EFAU004_01479		Mg ²⁺ cation transporter	138,9565075	54,3743741	-2,555551394	8,88E-05
EFAU004_01495		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIA component	39,25553689	5,322011555	-7,376071338	7,79E-03
EFAU004_01498		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIB component	63,56017837	8,340164444	-7,620974238	5,43E-03
EFAU004_01499		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IID component	64,67273415	5,480131713	-11,80131018	2,25E-03
EFAU004_01500		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIC component	51,79003931	3,457657663	-14,97835944	2,25E-03
EFAU004_01945		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIB component	13,55233991	3,735505951	-3,62797974	3,07E-02

Annexe 9 : Gènes dont l'expression est augmentée chez le mutant délété de *ern0160* par rapport à la souche native (RNA-seq)

Gene ID	Name	Product	Expression Aus0004	Expression Aus0004Δ <i>ern0160</i>	Fold Change	Adjusted P-value
Amino acid biosynthesis and metabolism						
EFAU004_00470		2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-carboxylate N-succinyltransferase	57,43439109	178,3047575	3,104494609	2,82E-02
EFAU004_00471		aspartate-semialdehyde dehydrogenase	41,83010471	136,7721567	3,269706296	1,23E-02
EFAU004_00472		aspartate kinase	28,67793749	104,9831924	3,660765089	6,09E-03
EFAU004_01576		prephenate dehydratase	65,33597094	166,7807223	2,552663102	3,36E-02
EFAU004_01578	<i>aroA</i>	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	115,6814893	297,6099201	2,572666742	3,12E-02
EFAU004_01579		prephenate dehydrogenase	90,02078305	263,1644149	2,923373981	1,09E-02
EFAU004_01580	<i>aroC</i>	chorismate synthase	59,75090675	198,1805554	3,316779045	3,28E-03
EFAU004_01581		3-dehydroquinate synthase	76,96665091	237,9323666	3,091369623	5,43E-03
Hypothetical, unclassified, unknown						
EFAU004_00454		hypothetical protein	162,037942	402,1903083	2,482074897	3,12E-02
EFAU004_00792		hypothetical protein	93,19330419	270,7090937	2,904812701	2,37E-03
EFAU004_01378		hypothetical protein	238,6875517	647,2446444	2,711681609	3,08E-02
EFAU004_01380		hypothetical protein	67,49943253	189,881142	2,813077604	9,59E-03
EFAU004_01401		flavodoxin	97,84876297	235,0747431	2,402429381	3,93E-02
EFAU004_01745		hypothetical protein	86,38088917	257,9630176	2,986343624	2,21E-02
EFAU004_01895		hypothetical protein	30,91066313	93,9686287	3,040006884	1,88E-02
EFAU004_02176		thioredoxin domain-containing protein	39,86679326	106,8949639	2,681303289	4,17E-02
EFAU004_02221		hypothetical protein	72,05846474	197,3759257	2,739108117	3,12E-02
Membrane proteins						
EFAU004_00024		acid-resistance membrane protein	63,82325878	200,6770286	3,144261706	1,56E-02
EFAU004_00162		glycerol uptake facilitator protein	124,2859489	342,8434957	2,758505678	2,96E-02
EFAU004_00456		membrane protein	62,61152854	185,1970667	2,957874868	1,88E-02
Nucleotide biosynthesis and metabolism						
EFAU004_00720		anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase activating protein	31,27877528	127,2806426	4,069233576	1,28E-03
EFAU004_00721		anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase	73,39384998	332,1410534	4,52546165	4,23E-05
Putatives enzymes						
EFAU004_00606		putative lysine decarboxylase	46,23696881	139,1011102	3,008439217	5,56E-03
EFAU004_00607		Nucleoside 2-deoxyribosyltransferase	32,81289848	94,89842277	2,892107286	3,12E-02
EFAU004_01067	<i>uppP</i>	undecaprenyl-diphosphatase	132,0607414	374,5703384	2,836348898	2,82E-02
EFAU004_01110	<i>purQ</i>	Phosphoribosylformylglycinamide synthase I	4,578708103	21,38626441	4,670807557	3,97E-02
EFAU004_01117	<i>purE</i>	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit	15,70971715	65,149826917	4,149826917	1,74E-02
EFAU004_01379		glycosyl transferase family protein	175,04261	450,659918	2,57457266	3,12E-02
EFAU004_02519		adenine deaminase	38,20781432	170,1644986	4,453656971	1,09E-02
Transport of small molecules						
EFAU004_00235		calcium-translocating P-type ATPase	76,27606847	199,7948377	2,619364654	1,93E-02
EFAU004_00644	<i>pnuC</i>	nicotinamide mononucleotide transporter PnuC	43,16062337	196,6294192	4,555759482	6,69E-03
EFAU004_01045		amino acid/peptide transporter	39,01646665	137,9427272	3,53550024	1,28E-02
EFAU004_02278		ABC transporter ATP-binding protein	9,741030812	37,13252783	3,811971089	2,82E-02
sRNA						
Putative_sRNA_0030			327,7705148	1439,910906	4,393045869	8,88E-05
Putative_sRNA_0170			7,700849014	61,58801779	7,997562045	5,23E-06

Annexe 10 : Gènes dont l'expression est diminuée dans la souche de surexpression de l'Ern0160 par rapport à la souche complémentée plasmide vide (RNA-seq)

Gene ID	Name	Product	Expression Aus0004Δern0160 _pAT29	Expression Aus0004Δern0160 _pAT29Ωern0160	Fold Change	Adjusted P- value
Adaptation, Protection						
EFAU004_01147	<i>fosX</i>	fosfomycin resistance protein FosX domain protein	48,38595093	4,625087257	-10,46162986	7,027E-12
EFAU004_01249		universal stress protein	111,5995148	42,62305513	-2,618289902	9,8688E-05
EFAU004_01384		Beta-lactamase	50,41572432	18,1552172	-2,776927632	0,000804883
EFAU004_02507		universal stress protein	850,0992872	391,4510799	-2,171661622	0,000886435
Amino acid biosynthesis and metabolism						
EFAU004_00338		tyrosine decarboxylase	20,92756944	3,19635417	-6,547324962	7,72228E-05
EFAU004_00401		tyrosyl-tRNA synthetase	399,6039142	191,0816557	-2,091273036	0,012163521
EFAU004_01105	<i>purH</i>	bifunctional purine biosynthesis protein PurH	16,449354	4,368407756	-3,765526232	0,022764504
EFAU004_01580	<i>aroC</i>	chorismate synthase	152,0317372	71,65862297	-2,121611202	0,014364217
EFAU004_01581		3-dehydroquinase synthase	172,9604598	77,59758438	-2,22894129	0,016151323
Carbon compound catabolism						
EFAU004_00254		2-dehydro-3-deoxygluconokinase	704,5211918	89,34253407	-7,885619085	3,0212E-27
EFAU004_00393		dihydroxyacetone kinase subunit DhaK	162,369786	42,99991985	-3,776048573	7,16604E-11
EFAU004_00394		dihydroxyacetone kinase, DhaL subunit	85,14462199	23,8221601	-3,574177222	1,8123E-06
EFAU004_01735	<i>arcB</i>	ornithine carbamoyltransferase	17089,23115	4060,437179	-4,208717041	0
EFAU004_01744		UDP-glucose 4-epimerase	2900,966353	306,7118173	-9,458280345	1,8028E-70
EFAU004_01946		tagatose-6-phosphate kinase	12,70650024	2,989155838	-4,250865772	0,022706424
EFAU004_01947	<i>lacD2</i>	tagatose 1,6-diphosphate aldolase	16,30052719	4,410646552	-3,695722837	0,024302199
EFAU004_01948		sugar isomerase	29,00124109	10,64747797	-2,723766245	0,012816329
Cell wall / LPS / capsule						
EFAU004_00866		cell envelope-related function transcriptional attenuator common domain-containing protein	25,51066746	8,397760076	-3,037794273	0,008162552
EFAU004_01508		LPXTG-motif protein cell wall anchor domain protein	15,08486072	4,238132953	-3,559317485	0,034005911
EFAU004_01867		cell wall surface anchor family protein (EcbA)	6,561080696	0,859727862	-7,631578535	0,039404375
EFAU004_02120		cell wall surface anchor family protein	14,07451774	2,857385726	-4,925662507	0,017875392
DNA replication, recombination, modification and repair						
EFAU004_00719		DNA polymerase IV	357,8900435	124,9212733	-2,864924717	4,19525E-08
EFAU004_01326		excinuclease ABC	70,77339389	19,70237662	-3,59212471	4,1416E-06
EFAU004_02147	<i>xerC</i>	site-specific tyrosine recombinase XerC-family	267,2681277	125,7440893	-2,125492571	0,002263102
EFAU004_00392		dihydroxyacetone kinase, phosphotransfer subunit	123,4580305	33,10633136	-3,729136556	5,46586E-10
Hypothetical, unclassified, unknown						
EFAU004_00033		hypothetical protein	68,92788801	13,86444886	-4,971556296	2,91621E-10
EFAU004_00034		hypothetical protein	70,18199245	11,225116953	-6,252211697	6,19347E-12
EFAU004_00035		hypothetical protein	53,30943901	14,59978092	-3,65138623	6,80955E-06
EFAU004_00036		hypothetical protein	66,50234621	18,91933857	-3,515046045	6,77804E-07
EFAU004_00038		DeoR-like helix-turn-helix protein	413,5846436	24,32620377	-17,00161059	4,10177E-65
EFAU004_00169		BioY family protein	63,48123379	27,05004414	-2,346807032	0,00327654

Gene ID	Name	Product	Expression Aus0004Δern0160 pAT29	Expression Aus0004Δern0160 pAT29Ωern0160	Fold Change	Adjusted P- value
EFAU004_00227		plasmid stabilization system protein	73,62460862	23,14236568	-3,181377809	0,000145963
EFAU004_00181	<i>msrB</i>	peptide methionine sulfoxide reductase MsrB	97,2253331	46,71793598	-2,081113625	0,017158649
EFAU004_00205		hypothetical protein	262,4015035	84,53878426	-3,103918584	6,75723E-09
EFAU004_00269		hypothetical protein	13,44414518	3,563014167	-3,773250553	0,046706199
EFAU004_00271		hypothetical protein	52,31749672	19,76016355	-2,64762468	0,001145596
EFAU004_00333		myosin-cross-reactive antigen-like protein	107,724698	34,95674093	-3,081657359	1,11016E-06
EFAU004_00334		hypothetical protein	39,31099076	10,70974014	-3,670583062	9,82553E-05
EFAU004_00369		HTH domain protein	90,90918187	38,51899584	-2,360112975	0,012163521
EFAU004_00374		DJ-1/Pfpl family protein	262,7561227	104,5545852	-2,513099949	1,9879E-05
EFAU004_00376		helix-turn-helix domain-containing protein	189,782353	82,97258249	-2,287289938	0,000575276
EFAU004_00423		hypothetical protein	101,5698064	25,97060469	-3,910952694	1,40655E-08
EFAU004_00449		periplasmic solute binding protein	562,1688041	207,3390778	-2,711349978	1,97163E-06
EFAU004_00453		accessory regulator agrBfs protein	4691,361286	2032,758744	-2,307879034	6,858E-05
EFAU004_00501		hypothetical protein	182,8662465	86,92626631	-2,103693789	0,002794543
EFAU004_00508		hypothetical protein	15,62162719	4,006106269	-3,89945402	0,019110354
EFAU004_00600		hypothetical protein	44,0840912	8,389501846	-5,254673282	3,45484E-07
EFAU004_00660		M protein trans-acting positive regulator	24,60528328	9,254980436	-2,658599167	0,030371794
EFAU004_00684		helix-turn-helix domain-containing protein	123,9325846	53,0871144	-2,334513488	0,00066112
EFAU004_00705		hypothetical protein	53,65566744	16,4598332	-3,259794117	0,00049647
EFAU004_00747		hypothetical protein	46,48770893	21,51267635	-2,160944932	0,038152388
EFAU004_00792		hypothetical protein	176,7851357	84,61091527	-2,089389237	0,024046463
EFAU004_00855		hypothetical protein	35,4058927	8,233906562	-4,300011475	4,94689E-05
EFAU004_00864		hypothetical protein	48,20676199	23,13439673	-2,083770005	0,046706199
EFAU004_00883		peroxiredoxin, Ohr family protein	95,76138438	47,71285857	-2,007035153	0,016812708
EFAU004_00914		hypothetical protein	349,7068774	170,5876822	-2,05001248	0,002260089
EFAU004_00917		hypothetical protein	47,87481052	13,19784968	-3,62747051	4,16799E-05
EFAU004_00918		hypothetical protein	79,05466554	31,28010183	-2,52731484	0,000645631
EFAU004_00922		hypothetical protein	103,2669983	49,79622279	-2,073791796	0,010845685
EFAU004_00929		M protein trans-acting positive regulator	11,348382	2,061665273	-5,50447357	0,015105028
EFAU004_00946		toxin-antitoxin system, toxin component, Fic family	137,6531648	23,98290344	-5,739637201	5,4401E-16
EFAU004_00947		putative addiction module antidote	273,4800897	60,2616606	-4,538210314	2,03056E-08
EFAU004_01012		hypothetical protein	30,23882835	9,19460541	-3,288757592	0,002964413
EFAU004_01023		alpha3-beta1 integrin-binding family protein	89,26357249	40,99390399	-2,17748406	0,005605991
EFAU004_01052		hypothetical protein	53,26765969	9,907654666	-5,376414649	1,47866E-08
EFAU004_01055		hypothetical protein	70,89364654	18,05126802	-3,92734995	5,77428E-08
EFAU004_01059		peptidoglycan-binding protein LysM	109,585578	37,0917657	-2,954444899	0,000918497
EFAU004_01142		hypothetical protein	28,96138675	9,248753301	-3,131382773	0,004105658
EFAU004_01150		LysM domain-containing protein	179,3246383	59,13266702	-3,032581606	4,38234E-05
EFAU004_01158		hypothetical protein	29,25500133	6,485040414	-4,511151737	0,000357012
EFAU004_01159		hypothetical protein	65,49556152	24,0876646	-2,71904988	0,000298591
EFAU004_01165		hypothetical protein	59,00860953	24,37230375	-2,421133846	0,00226959
EFAU004_01215		C4-dicarboxylate anaerobic carrier	890,896882	256,8100735	-3,469088537	3,51831E-10
EFAU004_01237		hypothetical protein	27,25623795	9,137367507	-2,982942071	0,00787559

Gene ID	Name	Product	Expression Aus0004Δern0160 pAT29	Expression Aus0004Δern0160 pAT29Ωern0160	Fold Change	Adjusted P- value
EFAU004_01241		hypothetical protein	44,73688838	14,10705885	-3,171241351	0,000330653
EFAU004_01245		hypothetical protein	45,94712005	8,453272405	-5,43542404	1,04273E-05
EFAU004_01256		hypothetical protein	157,945137	77,53191799	-2,037162772	0,034038988
EFAU004_01260		PRD domain-containing protein	109,7072841	35,19286786	-3,11731583	5,96921E-07
EFAU004_01265		hypothetical protein	72,84133	23,26324884	-3,131176152	2,48014E-05
EFAU004_01305		hypothetical protein	58,76223277	24,69692129	-2,379334334	0,003941599
EFAU004_01334		hypothetical protein	372,3869134	151,0948315	-2,464590679	0,000432612
EFAU004_01472		helix-turn-helix domain-containing protein	18,36393023	5,363378257	-3,423948369	0,017273328
EFAU004_01480		hypothetical protein	190,7286789	75,43554049	-2,528366306	0,000221992
EFAU004_01485		hypothetical protein	53,19369583	19,32485959	-2,752604518	0,000515723
EFAU004_01492		hypothetical protein	43,15073329	13,93184587	-3,097273233	0,000400762
EFAU004_01494	<i>UxuA_1</i>	D-mannonate dehydratase	11,57941234	1,536917911	-7,534177499	0,010856956
EFAU004_01496		hypothetical protein	17,69717519	1,61875638	-10,93257479	6,49066E-05
EFAU004_01497		hypothetical protein	16,94506541	1,311963013	-12,91581031	0,000150172
EFAU004_01505		phosphosugar isomerase transcriptional regulator	128,1326019	41,0229923	-3,123433829	1,16181E-06
EFAU004_01511		hypothetical protein	158,3904672	23,43023758	-6,760087969	5,79269E-21
EFAU004_01512		hypothetical protein	267,98513	50,69915478	-5,28579088	1,91856E-08
EFAU004_01524		hypothetical protein	42,53746323	16,25247778	-2,617290963	0,00446123
EFAU004_01525		hypothetical protein	106,0875901	37,80447309	-2,806217928	7,39404E-05
EFAU004_01526		alpha crystallin family heat shock protein	75,04453995	25,26971906	-2,96974176	1,59567E-05
EFAU004_01536	<i>clpB</i>	ATP-dependent chaperone protein ClpB	693,7433108	175,8215864	-3,94572319	2,23765E-14
EFAU004_01573		response regulator receiver domain-containing protein	40,92260341	10,64949755	-3,842679263	5,04042E-05
EFAU004_01604		hypothetical protein	17,99135709	5,571501393	-3,229175732	0,024719897
EFAU004_01627		hypothetical protein	17,3961622	3,275299665	-5,311319261	0,00195264
EFAU004_01659		hexose kinase, 1-phosphofruktokinase family protein	2977,47944	1115,254123	-2,66977667	6,00559E-06
EFAU004_01660		DeoR-like helix-turn-helix protein	4386,799385	1745,965186	-2,512535427	6,47821E-06
EFAU004_01662		hypothetical protein	63,79147107	19,19157591	-3,323930841	4,66144E-06
EFAU004_01683		hypothetical protein	75,89869874	34,45375125	-2,202915386	0,007004043
EFAU004_01684		hypothetical protein	120,3864251	32,40873589	-3,714628843	2,33187E-08
EFAU004_01685		hypothetical protein	55,3404079	17,9782761	-3,078182113	0,000310921
EFAU004_01686	<i>whiA</i>	Sporulation Regulator WhiA N terminal	192,8181983	82,694865	-2,331682848	0,000691527
EFAU004_01702		DJ-1/Pfpl family protein	50,03464257	21,9456501	-2,279934399	0,015581392
EFAU004_01706		hypothetical protein	76,80398461	28,00460034	-2,742548856	0,000449018
EFAU004_01770		hypothetical protein	13,78799483	3,955528067	-3,485753254	0,046964914
EFAU004_01775		hypothetical protein	173,1125027	82,75959341	-2,091751489	0,008999363
EFAU004_01776		hypothetical protein	58,31558379	7,966651748	-7,319961463	3,3567E-08
EFAU004_01777		hypothetical protein	236,5913732	111,4236889	-2,123348953	0,017158649
EFAU004_01790		hypothetical protein	59,48634315	19,78661012	-3,006393858	6,858E-05
EFAU004_01791		hypothetical protein	22,86560755	5,187609198	-4,407735178	0,000999094
EFAU004_01798		hypothetical protein	81,49158768	15,73031596	-5,1805436	1,09552E-11
EFAU004_01822		hypothetical protein	19,40222898	2,41212725	-8,043617508	4,51188E-05
EFAU004_01886		phosphate-binding protein	19,0262854	6,294144944	-3,022854665	0,030618791
EFAU004_01907		hypothetical protein	23,92781524	3,251348284	-7,359351613	8,47398E-06

Gene ID	Name	Product	Expression Aus0004Δern0160 pAT29	Expression Aus0004Δern0160 pAT29Ωern0160	Fold Change	Adjusted P- value
EFAU004_01908		hypothetical protein	32,90780033	5,394739989	-6,099978942	1,44179E-06
EFAU004_01912		hypothetical protein	40,11117583	16,79098929	-2,388851255	0,016869742
EFAU004_01918		hypothetical protein	18,51889918	6,059340485	-3,056256573	0,026327538
EFAU004_01932		hypothetical protein	282,1576756	131,5358435	-2,145101047	0,001228411
EFAU004_02006		phosphosugar-binding transcriptional regulator	90,36141767	29,28827011	-3,085242568	3,48511E-06
EFAU004_02041		ribosomal subunit interface protein	720,8007066	286,0873219	-2,519512929	9,40503E-05
EFAU004_02042		competence protein ComFC	89,51467914	31,93985856	-2,802600987	4,04907E-05
EFAU004_02045		hypothetical protein	53,02000061	21,90942327	-2,419963317	0,004539527
EFAU004_02050		ROK family protein	43,5215807	19,30569098	-2,254339445	0,024454465
EFAU004_02104		putative type IV conjugative transfer system protein TraL	250,1046263	111,5374409	-2,242337857	0,001785415
EFAU004_02121		hypothetical protein (SwpA)	7,372239972	0,77344849	-9,53164957	0,024719897
EFAU004_02176		thioredoxin domain-containing protein	504,7088216	78,59358914	-6,421755605	7,76838E-14
EFAU004_02217		hypothetical protein	60,31845222	15,0230446	-4,015061781	6,06287E-07
EFAU004_02230		Ser/Thr protein phosphatase family protein	374,0035798	176,5393153	-2,11852855	0,000666249
EFAU004_02231		hypothetical protein	113,1624239	31,73380981	-3,565989227	2,25727E-06
EFAU004_02245		permease	20,51496249	4,930814611	-4,160562526	0,002410195
EFAU004_02251		hypothetical protein	24,76512612	8,690008338	-2,849839166	0,02085231
EFAU004_02261		hypothetical protein	44,72176297	14,70359824	-3,041552294	0,000496532
EFAU004_02293		Enterocin A Immunity	71,05088935	24,36662731	-2,915909881	3,9823E-05
EFAU004_02296		hypothetical protein	264,3621086	132,0097122	-2,002595902	0,006158694
EFAU004_02329		rhodanese-like domain-containing protein	67,755409	11,07222209	-6,1194048	1,84247E-07
EFAU004_02359		Abi family protein	32,35571777	9,984155198	-3,240706612	0,001304712
EFAU004_02410		hypothetical protein	18,68057219	6,154968464	-3,035039464	0,040731031
EFAU004_02456		hypothetical protein	77,6157272	32,11321445	-2,416940457	0,00086333
EFAU004_02468		hypothetical protein	299,828386	142,1935217	-2,108593854	0,001829556
EFAU004_02506		hypothetical protein	325,223397	140,7963586	-2,309885001	0,00228422
EFAU004_02571		hypothetical protein	36,16712256	2,245029236	-16,10986707	7,24857E-10
EFAU004_02687		branched-chain amino acid transport protein	58,84146243	24,41122871	-2,410426084	0,003923293
EFAU004_02759		CobW/P47K family protein	139,0844001	53,09647453	-2,619465818	1,43046E-05
EFAU004_02761		hypothetical protein	92,72112694	26,36254462	-3,517153912	2,38209E-07
EFAU004_02762		periplasmic solute binding family protein	186,9168182	63,43646731	-2,946519977	8,65825E-08
EFAU004_02763		hypothetical protein	142,7796493	55,77893891	-2,559741224	0,000400918
EFAU004_02764		cobalamin synthesis protein	370,889772	156,9286305	-2,36342961	8,40077E-05
EFAU004_02766		hypothetical protein	317,5839027	157,2283436	-2,019889642	0,00345584
EFAU004_02849		negative regulator of genetic competence ClpC/MecB	690,2594605	294,563164	-2,343332585	0,000472939
Membrane proteins						
EFAU004_00379		glycerol uptake facilitator protein	42,07363649	6,506273657	-6,466625708	7,92115E-09
EFAU004_00890		integral membrane protein	168,362901	10,39659331	-16,1940451	1,63518E-36
EFAU004_01216		membrane protein	877,6002015	133,7547592	-6,561263365	1,8891E-24
EFAU004_02227		integral membrane protein	92,26329592	40,26268971	-2,291533342	0,005696702
EFAU004_02264		membrane protein	250,9746556	37,12643641	-6,759998531	9,05184E-25
EFAU004_02346		integral membrane protein	14,32813502	2,74994659	-5,210332109	0,013433909
EFAU004_02631		membrane protein	604,1319776	117,6907382	-5,133215975	1,09302E-20

Gene ID	Name	Product	Expression Aus0004Δern0160 pAT29	Expression Aus0004Δern0160 pAT29Ωern0160	Fold Change	Adjusted P- value
Nucleotide biosynthesis and metabolism						
EFAU004_00375		pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	211,4765549	104,6011991	-2,021741209	0,005995747
EFAU004_00503		pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	72,97999283	32,97182497	-2,213404714	0,007192984
EFAU004_00971		pyrimidine operon regulatory protein/uracil phosphoribosyltransferase PyrR	173,0529167	68,55526103	-2,524283535	0,000314669
EFAU004_01096		guanosine 5'-monophosphate oxidoreductase	169,5947623	35,83624015	-4,732493186	6,52992E-15
EFAU004_01118		xanthine permease	248,7733353	76,98718211	-3,231360448	2,11307E-07
EFAU004_01119	<i>xpt</i>	xanthine phosphoribosyltransferase	287,1181538	98,88899938	-2,90343876	1,16983E-06
EFAU004_01296		xanthine/uracil/vitamin C permease	52,29212877	11,08285464	-4,718290592	6,80294E-08
EFAU004_02186		pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	118,3698177	27,14749893	-4,360247624	9,7827E-12
Putative enzymes						
EFAU004_00025		pyruvate oxidase	207,9314547	79,27478422	-2,622920475	2,22946E-05
EFAU004_00037		HAD superfamily hydrolase	334,7787293	19,35773977	-17,2943088	1,43408E-60
EFAU004_00039		6-phospho-beta-galactosidase	819,623097	4,313789144	-190,0007324	3,2981E-82
EFAU004_00042		Glycosyl hydrolase family 53	266,8994026	5,822409718	-45,84002424	2,21749E-45
EFAU004_00223		zinc-containing alcohol dehydrogenase	95,99352663	41,14101748	-2,333280325	0,00524308
EFAU004_00228		mannosyl-glycoprotein endo-beta-N-acetylglucosaminidase	14,46742451	3,520991194	-4,108906758	0,022187454
EFAU004_00229		mannosyl-glycoprotein endo-beta-N-acetylglucosaminidase	10,52167538	1,955460211	-5,380664524	0,022764504
EFAU004_00247		rhamnulokinase	11,48855872	2,50164782	-4,59239651	0,021561286
EFAU004_00248		L-rhamnose isomerase	12,39769504	2,798970775	-4,429376378	0,028162535
EFAU004_00253		keto-hydroxyglutarate-aldolase/keto-deoxy- phosphogluconate aldolase	504,6522912	64,53742891	-7,819528911	3,49491E-54
EFAU004_00255	<i>kdul1</i>	4-deoxy-L-threo-5-hexosulose-uronate ketol-isomerase	797,4083491	112,0629957	-7,115715084	4,37621E-30
EFAU004_00256		gluconate 5-dehydrogenase	300,8313617	43,86227928	-6,858543758	8,6584E-25
EFAU004_00268		hydantoinase/oxoprolinase	17,64479768	4,354172996	-4,052387834	0,009717408
EFAU004_00322		oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein	186,7888124	25,08536738	-7,446126247	9,41829E-25
EFAU004_00325		beta-glucosidase	41,68562467	15,33786246	-2,717824911	0,003068382
EFAU004_00329		GNAT family acetyltransferase	37,6344097	6,758114011	-5,568774016	8,47593E-07
EFAU004_00362		GNAT family acetyltransferase	68,66430641	33,49149584	-2,050201243	0,023743462
EFAU004_00367		glucan 1,6-alpha-glucosidase	144,0645648	13,21416652	-10,90228163	1,16256E-29
EFAU004_00368		6-phospho-beta-glucosidase	129,8225092	16,16153411	-8,032808536	1,67369E-17
EFAU004_00373		oxidoreductase FAD/FMN-binding protein	202,760453	73,63967902	-2,753413047	1,31651E-06
EFAU004_00377		glycerol kinase	391,4793146	50,42231201	-7,764009601	2,00418E-39
EFAU004_00378		alpha-glycerophosphate oxidase	222,6484946	28,13131951	-7,914612556	4,41918E-33
EFAU004_00406		aldose 1-epimerase	1960,904309	334,5605926	-5,861133536	1,63215E-23
EFAU004_00407		beta-phosphoglucomutase	3112,375897	375,6599472	-8,285088469	2,15654E-29
EFAU004_00408		glycoside hydrolase, family 65	3824,411876	439,2356457	-8,70697065	0
EFAU004_00410		endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein	535,5821615	99,40829079	-5,387701139	8,52901E-19
EFAU004_00414		Phenolic acid decarboxylase	35,61264899	9,888471038	-3,601431288	0,000354205
EFAU004_00421		aromatic acid decarboxylase	23,66613404	8,368453377	-2,828017672	0,028111269
EFAU004_00461		glutathione peroxidase	194,3027163	91,31912418	-2,127733025	0,003064601
EFAU004_00466		diaminopimelate decarboxylase	58,91194675	23,11735946	-2,548385634	0,001005101
EFAU004_00467		diaminopimelate epimerase	53,96864369	26,55227286	-2,032543277	0,041267648

Gene ID	Name	Product	Expression Aus0004Δern0160 pAT29	Expression Aus0004Δern0160 pAT29Ωern0160	Fold Change	Adjusted P- value
EFAU004_00471		aspartate-semialdehyde dehydrogenase	98,13239672	45,70976765	-2,146858358	0,005811168
EFAU004_00472		aspartate kinase	90,21959029	42,39613411	-2,128014551	0,00890361
EFAU004_00481		galactokinase	5695,81162	530,092203	-10,7449451	4,43258E-78
EFAU004_00482		aldose 1-epimerase	10406,95617	975,7093725	-10,666041	0
EFAU004_00495		phosphoenolpyruvate carboxykinase	131,0481555	46,41266434	-2,823543044	3,97959E-06
EFAU004_00504		isochorismatase hydrolase	51,45793671	17,10199486	-3,008885054	0,000332394
EFAU004_00550		methylated-DNA--protein-cysteine methyltransferase	79,19256736	27,96612062	-2,831732311	8,46567E-05
EFAU004_00612		putative 6-phospho-beta-glucosidase	108,7472535	46,39702383	-2,343841146	0,000693658
EFAU004_00701		fructose-1,6-bisphosphate aldolase	65,99675363	25,35842058	-2,602557735	0,001014145
EFAU004_00732		lipoyltransferase and lipoate-protein ligase A	167,7183332	79,2240166	-2,117013759	0,019214506
EFAU004_00862		N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase	477,0693279	143,0905708	-3,334037494	1,43306E-10
EFAU004_00877		mannitol dehydrogenase protein	19,83085829	5,14403295	-3,855118831	0,004932473
EFAU004_00878		mannonate dehydratase	11,26693919	2,594723789	-4,342249931	0,030022937
EFAU004_00886		alpha amylase	233,078712	5,647805764	-41,26889659	8,71883E-47
EFAU004_00915	<i>clpX</i>	ATP-dependent protease ATP-binding subunit ClpX	398,5049568	160,7824295	-2,478535485	4,80446E-06
EFAU004_00919		phosphomethylpyrimidine kinase	91,16601602	37,35980185	-2,440216797	0,000885898
EFAU004_00935		oxidoreductase family, NAD-binding Rossmann fold protein	1390,862797	336,3291725	-4,13542122	9,35935E-13
EFAU004_00967		carbamoyl-phosphate synthase small subunit	124,7390581	52,37166856	-2,381804161	0,000308562
EFAU004_00968		Dihydroorotase	126,4742551	40,61678987	-3,113841727	5,96921E-07
EFAU004_00969		aspartate carbamoyltransferase	192,295976	72,75060984	-2,6432215	0,000159313
EFAU004_00976	<i>fts2</i>	Formate--tetrahydrofolate ligase	72,34517185	26,61005114	-2,718716002	9,8688E-05
EFAU004_00988		NAD-dependent nucleoside-diphosphate-sugar epimerase	14,36868374	3,294773296	-4,361053841	0,011550421
EFAU004_00989		Putative 8-amino-7-oxononanoate synthase/2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	17,84873793	5,860304928	-3,04570123	0,035719739
EFAU004_01020		glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	560,8615247	204,9112319	-2,73709508	4,41969E-07
EFAU004_01060		GNAT family acetyltransferase	139,5785222	45,9133141	-3,040044592	7,089E-07
EFAU004_01101		sensor histidine kinase	23,55802603	2,718155204	-8,666917176	4,18076E-06
EFAU004_01103		oxidoreductase, aldo/keto reductase family protein	135,3120347	54,81155519	-2,468677166	0,000122385
EFAU004_01108		Amidophosphoribosyltransferase	10,49391864	2,459098617	-4,267384222	0,043551942
EFAU004_01137		D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase	8,521568666	1,198872787	-7,107984066	0,025331083
EFAU004_01151		TatD family hydrolase	73,91679044	8,695875736	-8,500212362	2,1819E-16
EFAU004_01174		aldose 1-epimerase	315,2763574	127,5503076	-2,471780456	8,4748E-06
EFAU004_01214		Putative dipeptidase	293,5832672	107,7162044	-2,725525551	9,99707E-07
EFAU004_01268		L-xylulose 5-phosphate 3-epimerase	7,774894595	1,12261485	-6,925700826	0,048618493
EFAU004_01333	<i>clpE</i>	UvrB/UvrC protein/AAA ATPase	645,7850741	216,7814119	-2,978968854	1,24214E-07
EFAU004_01474		transglycosylase	27,80939628	8,192686588	-3,394417201	0,004766399
EFAU004_01478		short chain dehydrogenase/reductase family oxidoreductase	191,4892288	77,82768068	-2,460425739	4,508E-05
EFAU004_01483		HAD superfamily hydrolase	64,23556167	21,11692031	-3,041900084	2,68736E-05
EFAU004_01484		Isochorismatase family protein	45,80999993	10,4251338	-4,394188199	4,68019E-06
EFAU004_01493		HAD superfamily hydrolase	12,18845319	1,953818596	-6,238272688	0,010941931
EFAU004_01503		4-phosphoerythronate dehydrogenase	17,45019708	0,572546236	-30,47823214	2,39909E-06
EFAU004_01504		6-phosphogluconate dehydrogenase	15,74447843	0,596685496	-26,38656131	1,11491E-05
EFAU004_01507		esterase	20,20355514	5,346809605	-3,778618772	0,02312557

Gene ID	Name	Product	Expression Aus0004Δern0160 pAT29	Expression Aus0004Δern0160 pAT29Ωern0160	Fold Change	Adjusted P- value
EFAU004_01509		isochorimatase family hydrolase	26,65694643	7,386013852	-3,60911135	0,001630645
EFAU004_01516		fructose-6-phosphate aldolase	11,67599046	1,129193985	-10,34011039	0,029117741
EFAU004_01575		sensor histidine kinase	39,1942559	10,75448659	-3,644456254	8,87478E-05
EFAU004_01576		prephenate dehydratase	153,4270031	73,91966638	-2,07559112	0,026157656
EFAU004_01583		Beta-galactosidase small subunit	367,1594081	28,91757044	-12,69675849	9,7653E-35
EFAU004_01584		Beta-galactosidase large subunit	733,9357097	58,47507306	-12,55125768	5,1399E-29
EFAU004_01585		alpha-galactosidase	584,1856069	33,90515514	-17,22999362	5,49548E-62
EFAU004_01705		YbaK/prolyl-tRNA synthetase-associated domain protein	45,4240037	22,00765149	-2,064009589	0,048552398
EFAU004_01707		excisionase family DNA binding domain	20,77668887	4,72641789	-4,395863709	0,002456014
EFAU004_01712		D-xylulose 5-phosphate/D-fructose 6-phosphate phosphoketolase	191,3886639	95,04308427	-2,013704262	0,005380339
EFAU004_01713		D-xylulose 5-phosphate/D-fructose 6-phosphate phosphoketolase	224,7288816	110,2265737	-2,038790412	0,004271871
EFAU004_01734		Carbamate kinase	2913,032385	892,1688913	-3,265113156	7,40879E-09
EFAU004_01736		arginine deiminase	20701,44195	4159,99979	-4,976308411	0
EFAU004_01743		galactose-1-phosphate uridylyltransferase	2890,618033	322,8523051	-8,953375855	5,14021E-68
EFAU004_01763		chologylglycine hydrolase family protein	44,56638648	16,41860672	-2,71438297	0,004544484
EFAU004_01801		alpha-acetolactate decarboxylase	181,4259803	56,85172845	-3,191213096	3,6175E-08
EFAU004_01802		acetolactate synthase	255,76606	100,0088165	-2,557435124	8,38688E-06
EFAU004_01905		N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	8,125945069	1,37632337	-5,904095828	0,025450764
EFAU004_01909		ATPase family protein	20,40242826	6,889678823	-2,961303245	0,027928257
EFAU004_02043		helicase	71,91466994	26,39453596	-2,724604443	0,000129
EFAU004_02072		succinyl-diaminopimelate desuccinylase	79,88276933	38,02749337	-2,100658293	0,015371538
EFAU004_02112		N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	33,00531608	8,378147659	-3,93945266	0,000107931
EFAU004_02122		L-lactate oxidase	113,3843325	10,39749528	-10,90496599	2,5362E-18
EFAU004_02126		GNAT family acetyltransferase	38,00538721	12,11370088	-3,137388615	0,000800941
EFAU004_02175		putative permease	43,17711373	18,43245092	-2,342451035	0,016588069
EFAU004_02192		ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	417,6620711	195,1870123	-2,139804622	0,006129277
EFAU004_02214		Aminopeptidase C	230,7698216	77,89681128	-2,962506652	1,15624E-07
EFAU004_02216		alpha/beta hydrolase family protein	39,23246632	13,06612508	-3,002609119	0,001096791
EFAU004_02228		HAD superfamily hydrolase	167,121902	76,05897459	-2,197267356	0,009860005
EFAU004_02330		azoreductase	329,2426301	153,3105	-2,147554343	0,000584287
EFAU004_02486		HAD superfamily hydrolase	34,973576	10,66657215	-3,278801804	0,000996451
EFAU004_02498		Cytochrome P450	218,0128049	108,4240838	-2,010741501	0,005515635
EFAU004_02519		adenine deaminase	61,12572791	12,07415393	-5,062526806	5,68465E-09
EFAU004_02546		mannitol dehydrogenase protein	34,07344558	6,135635947	-5,553368205	1,44949E-06
EFAU004_02547		altronate hydrolase	27,67192549	4,519301503	-6,123053634	8,0807E-06
EFAU004_02548		glucuronate isomerase	18,22539808	3,501676031	-5,204764211	0,001549848
EFAU004_02549		GDSL-like Lipase/Acylhydrolase	33,21691463	7,017862565	-4,733195373	0,000105549
EFAU004_02550		AP endonuclease	31,15999841	7,827788276	-3,980689987	0,000181597
EFAU004_02593		S-adenosylmethionine synthetase	277,2679213	129,391186	-2,142865599	0,007627337
EFAU004_02612		oligoendopeptidase, PepF/M3 family	197,7071705	78,39219965	-2,522026061	1,8361E-05
Related to phage, transposon, or plasmid						
EFAU004_01362		ISL3 family transposase	18,2230698	3,276971608	-5,560948333	0,00224809
EFAU004_01589		IS66 family transposase	39,3187078	14,43973602	-2,722951982	0,005733436

Gene ID	Name	Product	Expression Aus0004Δern0160 pAT29	Expression Aus0004Δern0160 pAT29Ωern0160	Fold Change	Adjusted P- value
EFAU004_01591		IS66 Orf2-like protein	35,7560477	8,792662006	-4,066578207	3,66702E-05
EFAU004_01779		ISEfm1, transposase	17,81108629	2,707091926	-6,579416871	0,000476592
EFAU004_02134		phage terminase	12,9334955	1,983694906	-6,519901555	0,033132552
EFAU004_02276		IS200/IS605 family transposase	22,92094848	7,052292416	-3,250141532	0,009116719
Transcription, RNA processing and degradation						
EFAU004_00784		transcriptional antiterminator bglG/Sigma-54 factor	57,53341741	24,33581334	-2,364146068	0,007878942
EFAU004_01246		transcriptional regulator Spx	15,04752824	2,570724842	-5,853418456	0,001846871
EFAU004_01261		transcriptional antiterminator bglG	123,0415654	37,7664355	-3,257960772	1,26543E-07
EFAU004_02009		transcriptional antiterminator bglG/CAT RNA-binding protein	23,32594809	8,48534317	-2,748969325	0,028336268
EFAU004_02260		transcriptional antiterminator bglG:Sigma-54 factor	84,70621645	22,84145891	-3,708441601	1,63502E-07
EFAU004_02573		transcriptional antiterminator bglG	130,7574811	8,801230021	-14,85672807	1,20043E-16
EFAU004_02850		firmicute transcriptional repressor of class III stress	860,5158156	351,6050118	-2,447393486	1,80185E-05
Transcriptional regulators						
EFAU004_00270		GntR family transcriptional regulator	82,49231728	35,99412207	-2,291827458	0,003693627
EFAU004_01999		Fur family transcriptional regulator	376,3615958	130,7901677	-2,877598541	8,27492E-06
EFAU004_02047		GntR family transcriptional regulator	42,89611226	12,17764975	-3,522528003	0,000109628
EFAU004_00252		IclR transcriptional regulator	233,4097931	98,90346961	-2,359975783	0,000118084
EFAU004_00372		MarR family transcriptional regulator	170,4380171	72,69726241	-2,344490169	0,000199788
EFAU004_00405		Lacl family transcriptional regulator	1604,595998	345,2619731	-4,64747387	7,61014E-19
EFAU004_00416		MerR family transcriptional regulator	260,9455156	66,14019678	-3,945339268	2,46717E-09
EFAU004_00611		Lacl family transcriptional regulator	154,4931755	62,85193518	-2,458049622	0,000143203
EFAU004_00884		MerR family transcriptional regulator	19,35786025	6,743027734	-2,870796474	0,034352686
EFAU004_01100		Lacl family transcriptional regulator	20,0820666	3,747149326	-5,359291785	0,000426384
EFAU004_01102		AraC family transcriptional regulator	27,1505237	5,259244137	-5,162438364	4,25847E-05
EFAU004_01290		LysR family transcriptional regulator	33,72204303	10,12089557	-3,331922832	0,000715289
EFAU004_01574		AraC family transcriptional regulator	55,13839657	12,30532308	-4,480857285	1,50308E-07
EFAU004_01586		Lacl family transcriptional regulator	64,70008998	17,22840974	-3,755430185	1,59699E-06
EFAU004_01742		Lacl family transcriptional regulator	978,5464808	94,62922535	-10,34084848	2,13592E-63
EFAU004_02185		AraC family transcriptional regulator	145,7552208	34,85409311	-4,181868119	5,24568E-11
EFAU004_02328		TetR family transcriptional regulator	393,0207671	80,11435819	-4,905746934	1,92396E-18
EFAU004_02545		Lacl family transcriptional regulator	214,4654741	88,94291681	-2,411270979	7,72228E-05
Translation, post-translational modification, degradation						
EFAU004_00067		translation elongation factor G	56,69693943	19,74268307	-2,871795047	0,000219397
EFAU004_00206		50S ribosomal protein L25	310,266668	96,23561166	-3,224031756	5,6578E-08
EFAU004_00222		30S ribosomal protein S14	72,02930499	12,09245743	-5,956548153	2,17664E-12
EFAU004_01233		translation elongation factor Tu	461,8554181	224,6705361	-2,055700877	0,00614529
EFAU004_02520	<i>trmB</i>	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase	60,66312471	27,47797058	-2,20770033	0,009098623
EFAU004_02765		50S ribosomal protein L33	179,1161748	75,81290951	-2,362607846	0,004932473
EFAU004_02768		30S ribosomal protein S14	257,4989181	120,3629883	-2,139352983	0,014399971
EFAU004_02861	<i>gidA</i>	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification protein	1708,206007	357,580971	-4,777116641	1,39001E-20
EFAU004_02862	<i>mmmE</i>	tRNA modification GTPase	1159,963804	271,7419292	-4,268622834	1,0016E-16
Transport of small molecules						

Gene ID	Name	Product	Expression Aus0004Δern0160 pAT29	Expression Aus0004Δern0160 pAT29Ωern0160	Fold Change	Adjusted P- value
EFAU004_00040		PTS system, lactose/cellobiose-specific IIA component	710,5756047	5,38068406	-132,0604586	5,71889E-73
EFAU004_00041		PTS system, lactose/cellobiose-specific IICB component	489,0330241	4,554225721	-107,3800584	3,88139E-60
EFAU004_00145		iron ABC transporter system permease	113,7729874	39,73336712	-2,863411676	3,83495E-06
EFAU004_00146		iron ABC transporter system permease	131,532429	50,06559066	-2,627202181	3,43485E-05
EFAU004_00147		iron ABC transporter ATP-binding protein	231,505173	88,17199233	-2,625608959	2,77103E-06
EFAU004_00148		iron ABC transporter substrate-binding protein	165,6601405	42,78607183	-3,871824018	2,17661E-10
EFAU004_00179		PTS system, trehalose/maltose-specific, IIBCA component	1676,086075	179,427738	-9,341287436	1,56327E-65
EFAU004_00204		MATE efflux family protein	371,3512109	119,4415291	-3,109062767	1,91856E-08
EFAU004_00267		citrate transporter	21,24068109	4,876244549	-4,355950748	0,001775222
EFAU004_00324		PTS system lactose/cellobiose-specific transporter subunit IIC	60,41776316	18,25906743	-3,308918343	8,84683E-06
EFAU004_00339		amino acid permease	15,43561713	4,667190105	-3,307261282	0,038802418
EFAU004_00409		PTS system glucose-specific transporter subunit IABC	2962,677535	375,4271341	-7,891484835	6,85342E-30
EFAU004_00417		major facilitator superfamily transporter	191,6955118	71,95934912	-2,663941714	5,89379E-06
EFAU004_00418		Urea transporter	208,81632	77,4628628	-2,695695878	1,44869E-05
EFAU004_00483		sodium/galactoside symporter	9648,51281	810,594678	-11,90300538	0
EFAU004_00545		major facilitator superfamily transporter	112,3372311	16,14460407	-6,958190528	5,76444E-18
EFAU004_00573		PTS system beta-glucoside-specific transporter subunit IABC	64,13785659	28,20791393	-2,273753981	0,005267608
EFAU004_00637		ABC transporter protein	62,91697781	25,83747187	-2,435105808	0,001728483
EFAU004_00639		SMR family multidrug resistance protein	62,20023677	28,9895514	-2,145608806	0,015294455
EFAU004_00699		PTS system fructose-specific transporter subunit IIA	25,97895341	6,284163067	-4,134035533	0,000384805
EFAU004_00700		PTS system fructose-specific transporter subunit IIBC (BepA)	37,17879185	8,488077374	-4,380119338	5,37643E-05
EFAU004_00704		transporter, major facilitator family protein	31,35769346	7,429151267	-4,220898502	9,98324E-05
EFAU004_00723		efflux ABC transporter permease	162,7558026	78,57517744	-2,071338658	0,004271871
EFAU004_00760		CorA-like Mg2+ transporter protein	56,91673897	25,75548955	-2,209887677	0,011790918
EFAU004_00887		extracellular solute-binding protein	448,6280031	15,61679678	-28,72727418	1,60867E-66
EFAU004_00888		ABC transporter permease	267,303038	7,319887924	-36,51736759	3,03147E-54
EFAU004_00889		ABC transporter permease	199,9194161	8,938159724	-22,36695498	6,09681E-43
EFAU004_00937		PTS system ascorbate-specific transporter subunit IIA	139,1453872	18,41501349	-7,556083913	2,7563E-15
EFAU004_00938		PTS system ascorbate-specific transporter subunit IIB	37,32694828	5,279605894	-7,070025495	3,98915E-08
EFAU004_00939		PTS system ascorbate-specific transporter subunit IIC	15,60182258	1,742656522	-8,952895984	0,000433366
EFAU004_00970		uracil permease	241,2715307	98,24410299	-2,455837281	0,002538473
EFAU004_00980		cation diffusion facilitator family transporter	78,34345007	23,96741965	-3,268747793	2,68457E-05
EFAU004_01152		ABC transporter ATPase	133,4867323	13,43694721	-9,934305035	2,6344E-29
EFAU004_01153		ABC-type transporter, periplasmic component	288,3818858	30,90206434	-9,332123659	3,16009E-37
EFAU004_01154		ABC transporter permease	307,7835151	37,52207063	-8,202732683	2,96001E-21
EFAU004_01242		calcium-translocating P-type ATPase	220,7606647	98,93462163	-2,231379279	0,002189769
EFAU004_01251		PTS system lactose/cellobiose-specific transporter subunit IIC	21,34051173	3,916989531	-5,44819218	0,000403411
EFAU004_01257		PTS system galactitol-specific transporter subunit IIC	106,8620026	51,32743394	-2,081966589	0,016396321
EFAU004_01258		PTS system galactitol-specific transporter subunit IIB	81,03395063	38,0446122	-2,129971787	0,01788726
EFAU004_01479		Mg2+ cation transporter	256,0376011	104,7665587	-2,443886717	3,1253E-05
EFAU004_01495		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIA component	10,27772453	1,120569894	-9,171872796	0,008380382
EFAU004_01498		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIB component	25,68706472	1,204459979	-21,32662369	4,33454E-06
EFAU004_01499		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IID component	18,43478512	1,167197798	-15,79405406	6,5893E-06

Gene ID	Name	Product	Expression Aus0004Δern0160 pAT29	Expression Aus0004Δern0160 pAT29Qern0160	Fold Change	Adjusted P- value
EFAU004_01500		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIC component	17,56230792	0,716040505	-24,5269755	5,07006E-06
EFAU004_01501		iron-containing alcohol dehydrogenase	16,82017996	0,6457651	-26,04690149	1,11205E-05
EFAU004_01502		iron-containing alcohol dehydrogenase	11,56056097	0,364999078	-31,67284974	9,0775E-05
EFAU004_01519		PTS system glucitol/sorbitol-specific transporter subunit IIBC	24,60078017	5,108187116	-4,815951259	0,036557544
EFAU004_01570		ABC transporter permease	13,00734837	3,428998191	-3,793337774	0,033975575
EFAU004_01658		PTS system fructose-specific transporter subunit IIBC	1716,51986	500,6460003	-3,428609953	1,79352E-09
EFAU004_01753	<i>fhuG</i>	ferrichrome transport system permease FhuG	65,16739107	29,21441996	-2,230658393	0,00652859
EFAU004_01754	<i>fhuB</i>	ferrichrome transport system permease FhuB	65,48391548	24,59920556	-2,662033752	0,000362851
EFAU004_01914	<i>copB</i>	copper-translocating P-type ATPase	351,0609025	142,9890265	-2,45515975	4,05956E-05
EFAU004_01915	<i>copA</i>	copper-translocating P-type ATPase	354,6047672	129,1610792	-2,745445991	4,29325E-07
EFAU004_01916	<i>copZ</i>	copper chaperone CopZ	226,6789543	97,35696802	-2,328327996	0,000105325
EFAU004_01917	<i>copY</i>	CopY/TcrY family copper transport repressor	259,0338501	109,0532856	-2,375296156	5,76253E-05
EFAU004_01921		cadmium-translocating P-type ATPase	150,2413101	71,90935279	-2,089315288	0,006158694
EFAU004_01942		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIA component	10,14660142	1,673247183	-6,06401823	0,027012376
EFAU004_01943		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IID component	12,06826789	2,000911762	-6,031384354	0,010789612
EFAU004_01944		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIC component	11,69383101	1,43950891	-8,12348637	0,00524308
EFAU004_01945		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIB component	15,78834441	3,031453799	-5,208175833	0,005665831
EFAU004_02044		PTS system cellobiose-specific transporter subunit IIB	187,6987717	72,78995116	-2,57863577	1,51362E-05
EFAU004_02105		ABC transporter ATP-binding protein	416,0033162	195,698816	-2,125732413	0,000618001
EFAU004_02258		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIB component	9,14963762	1,403922496	-6,517195677	0,04070753
EFAU004_02259		PTS system, mannose/fructose/sorbose-specific IIA component	9,107389047	1,171033564	-7,777222896	0,023249246
EFAU004_02266		ABC transporter ATP-binding protein	197,7868916	52,19809734	-3,789159024	1,20301E-11
EFAU004_02316		PTS system mannitol-specific transporter subunit IIA	6,952280001	0,507043929	-13,71139581	0,017378193
EFAU004_02317		PTS system, mannitol-specific IICBA component	9,847881033	0,447911178	-21,98623638	0,000885717
EFAU004_02326		ABC transporter ATP-binding protein/permease	539,6466145	114,1041193	-4,72942272	5,76444E-18
EFAU004_02327		ABC transporter ATP-binding protein/permease	290,0781053	57,41074583	-5,052679618	8,52901E-19
EFAU004_02347		inner membrane component transport system	11,57179608	1,837078264	-6,299021822	0,014051028
EFAU004_02348		ABC transporter permease	9,899368933	1,49495342	-6,621857781	0,01584031
EFAU004_02349		extracellular solute-binding protein	10,22583626	1,330101097	-7,688014302	0,00685719
EFAU004_02551		ABC transporter ATP-binding protein/permease	20,01858556	5,953386719	-3,362554207	0,010637006
EFAU004_02564		ABC transporter permease	16,74631808	4,246673531	-3,943396628	0,009137231
EFAU004_02565		ABC transporter permease	12,56352774	2,428107244	-5,174206274	0,009741739
EFAU004_02570		PTS system cellobiose-specific transporter subunit IIC	27,8948921	5,051922325	-5,521639153	6,94228E-05
EFAU004_02572		PTS system, cellobiose-specific IIA component	54,36071909	4,011583573	-13,5509377	5,90221E-15
EFAU004_02574		PTS system cellobiose-specific transporter subunit IIB	94,87635907	6,003739976	-15,80287612	6,24522E-13
EFAU004_02635		ABC transporter permease	56,65998395	26,90602188	-2,105847687	0,049246833
EFAU004_02636		ABC transporter ATP-binding protein	110,3281327	53,82415187	-2,049788596	0,014957737
EFAU004_02666		major facilitator superfamily transporter	26,15558253	10,67892602	-2,449270879	0,039794406
EFAU004_02833		ABC transporter substrate-binding protein	147,6753939	73,4912477	-2,009428314	0,009650534
EFAU004_02834		amino acid or sugar ABC transport system, permease protein	137,4735328	65,31113772	-2,104901822	0,003607163
EFAU004_02835		ABC transporter ATP-binding protein	131,18541	57,56207124	-2,279025184	0,000618001
sRNA						
6SRNA			3316,841551	1134,158215	-2,924496343	0,035652235

Gene ID	Name	Product	Expression Aus0004Δern0160 _pAT29	Expression Aus0004Δern0160 _pAT29Ωern0160	Fold Change	Adjusted P- value
Putative_sRNA_0300			115,817403	26,50701579	-4,369311275	6,06991E-07
Putative_sRNA_0980			118,0457662	52,16113967	-2,263097911	0,003280255
Putative_sRNA_1190			10,90746084	2,340970765	-4,65937508	0,030022937
Putative_sRNA_1530			123,818913	34,75787898	-3,56232649	1,00562E-06
Putative_sRNA_1900			136,8924953	56,48633842	-2,42346201	0,000310921
Putative_sRNA_1940			34,03484226	9,520802431	-3,574787157	0,002304933
sefa1496.1FMN			2748,629544	462,4635117	-5,943451699	1,04273E-13
sefa2424.1T-box			402,1282309	200,8640934	-2,001991616	0,016666174
srn_9180_sRNA82_Tn5801			32,67509581	10,7862898	-3,02931744	0,004822917

Annexe 11 : Gènes dont l'expression est augmentée dans la souche de surexpression de l'Ern0160 par rapport à la souche complétée plasmide vide (RNA-seq)

Gene ID	Name	Product	Expression Aus0004Δern0160 pAT29	Expression Aus0004Δern0160 pAT29Ωern0160	Fold Change	Adjusted P-value
Amino acid biosynthesis and metabolism						
EFAU004_00402		tyrosine decarboxylase	346,980369	804,8142905	2,319480762	2,782E-13
EFAU004_00464	<i>cysM</i>	cysteine synthase A	133,5678291	435,1410016	3,25782791	6,52529E-25
DNA replication, recombination, modification and repair						
EFAU004_01014	<i>recJ</i>	single-stranded-DNA-specific exonuclease RecJ	187,1202267	400,6110904	2,140928843	7,51543E-13
Hypothetical, unclassified, unknown						
EFAU004_00079		cytidine deaminase	215,9365291	650,5988322	3,012916966	7,31347E-20
EFAU004_00640		hypothetical protein	80,63482561	161,3351806	2,000812668	5,33951E-10
EFAU004_00671		helix-turn-helix domain-containing protein	44,23262309	94,04030012	2,126039415	1,2193E-08
EFAU004_00673		spermidine/putrescine ABC superfamily ATP binding cassette transporter, membrane protein	58,43168025	119,383726	2,043133545	6,99954E-10
EFAU004_00674	<i>potC</i>	spermidine/putrescine transport system permease protein PotC	70,50694584	152,9470996	2,169248685	2,06047E-11
EFAU004_00675	<i>potD</i>	spermidine/putrescine-binding periplasmic protein PotD	64,80522095	133,9526083	2,067003342	9,52958E-11
EFAU004_00685		helix-turn-helix domain-containing protein	6,276797913	12,68025831	2,020179474	0,031503436
EFAU004_00724		hypothetical protein	114,875114	280,0414998	2,437790832	4,94328E-14
EFAU004_00903		hypothetical protein	223,2981114	474,4135434	2,124574814	4,75517E-11
EFAU004_02427		EDD domain-containing protein, DegV family	170,2283828	409,8268537	2,407511878	1,72787E-13
EFAU004_02428		hypothetical protein	323,4767445	943,2510111	2,915977817	6,9361E-21
EFAU004_02578		hypothetical protein	20,08275129	71,59225764	3,564863031	4,97702E-15
Membrane proteins						
EFAU004_00162		glycerol uptake facilitator protein	374,3836977	979,2418161	2,615610194	3,06625E-16
EFAU004_00526		glucose uptake protein	84,29578905	201,3606656	2,388739318	2,58292E-11
Nucleotide biosynthesis and metabolism						
EFAU004_00077	<i>pdp</i>	pyrimidine-nucleoside phosphorylase	231,043226	592,3339785	2,563736617	5,18608E-17
Putative enzymes						
EFAU004_00078		deoxyribose-phosphate aldolase	207,7744148	549,8138917	2,646205945	1,02551E-15
EFAU004_00116		adenylate kinase	4021,761223	8074,380826	2,007672852	1,59596E-11
EFAU004_00692	<i>glnA</i>	glutamine synthetase, type I	27,92180393	398,3601098	14,26699044	2,50233E-82
EFAU004_00874		alkyl hydroperoxide reductase	67,40080731	138,1198675	2,049231648	1,55721E-10
EFAU004_00875		alkyl hydroperoxide reductase subunit C	77,54373287	218,9923184	2,8241137	2,24656E-18
EFAU004_00902		ATP-dependent Zn protease	331,0534583	766,8287213	2,316328986	5,61101E-13
EFAU004_01013		adenine phosphoribosyltransferase	253,9524634	529,6171778	2,085497304	5,38722E-12
Transcription, RNA processing and degradation						
EFAU004_00121		DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	7099,854512	14379,783	2,025363052	5,79759E-12
Transcriptional regulators						
EFAU004_00691		MerR family transcriptional regulator	56,03733408	1065,455976	19,01332377	7,62227E-93
Translation, post-translational modification, degradation						
EFAU004_00094		30S ribosomal protein S10 (RpsJ)	3519,306291	7144,671238	2,030136239	5,38722E-12

Gene ID	Name	Product	Expression Aus0004Δern0160 pAT29	Expression Aus0004Δern0160 pAT29Ωern0160	Fold Change	Adjusted P-value
EFAU004_00095		50S ribosomal protein L3	4023,439535	8273,310616	2,056278103	3,80041E-12
EFAU004_00100		50S ribosomal protein L22	3458,910703	7326,80999	2,118242018	4,21828E-09
EFAU004_00107		50S ribosomal protein L5	3011,477495	6204,854331	2,060402026	1,38106E-11
EFAU004_00111		50S ribosomal protein L18	3164,047908	6511,653453	2,058013545	8,22465E-10
EFAU004_00112		30S ribosomal protein S5	3355,730706	6824,23331	2,033605765	8,40955E-12
EFAU004_00113		50S ribosomal protein L30	3115,128121	7185,168254	2,306540205	4,05303E-12
EFAU004_00117		translation initiation factor IF-1	4107,841793	8791,468238	2,140167193	8,12502E-13
EFAU004_00118		50S ribosomal protein L36	4483,113652	9972,843599	2,224535083	5,4656E-12
EFAU004_00119		30S ribosomal protein S13	7541,800482	16438,75675	2,179685976	6,15356E-12
EFAU004_00120		30S ribosomal protein S11	7773,62596	16772,5751	2,157625693	5,35417E-13
EFAU004_02449		50S ribosomal protein L7/L12	2730,240663	5755,449688	2,108037495	4,05303E-12
Transport of small molecules						
EFAU004_00081		ABC transporter ATP-binding protein	259,2699345	655,0459163	2,526501647	2,798E-15
EFAU004_00082		ABC transporter permease	449,2369162	1166,772238	2,597231429	2,84053E-17
EFAU004_00083		ABC transporter permease	552,7069851	1330,281157	2,406847015	2,90174E-16
EFAU004_00489		ABC transporter ATP-binding protein	8,086660584	16,52226857	2,043150989	0,007449621
EFAU004_00490		metal ion ABC transporter permease	12,43756451	28,31409488	2,276498334	4,63136E-05
EFAU004_00901		Na dependent nucleoside transporter, NupC family	31,73932802	68,08504829	2,145132003	1,74739E-08
EFAU004_01693		amino acid ABC transporter amino acid-binding/permease	66,38716585	925,0497163	13,9341649	3,12077E-89
EFAU004_01694		amino acid ABC transporter ATP-binding protein	28,8579882	350,6932765	12,15238131	3,85965E-72
EFAU004_02588		ABC transporter ATP-binding protein	155,8649447	340,6346508	2,185447481	3,91678E-14
EFAU004_02589		ABC transporter ATP-binding protein	126,5194667	272,5730022	2,154395757	1,027E-12
sRNA						
Putative_sRNA_0170			19,17656795	1441,608173	75,17550464	4,3226E-134
Putative_sRNA_1180			184,1226365	428,4172462	2,326803778	6,31746E-14

Titre : Rôles d'ARN régulateurs exprimés par *Enterococcus faecium* et *Staphylococcus aureus* en réponse au stress antiseptique.

Mots clés : biocides ; sARN, concentration subinhibitrice, résistance : virulence.

Résumé : *Enterococcus faecium* et *Staphylococcus aureus* sont des bactéries pathogènes opportunistes de l'homme responsables d'épidémies hospitalières. Les antiseptiques sont très utilisés pour prévenir la survenue de ces infections et leur présence dans l'environnement hospitalier, même à faibles concentrations, dites subinhibitrices, constitue un stress auquel ces bactéries doivent s'adapter. Les ARN régulateurs (sARN) sont des acteurs importants pour l'adaptation aux variations environnementales des bactéries. Les preuves de leur existence sont anciennes chez *S. aureus* mais récentes chez *E. faecium*, entraînant un état des connaissances très hétérogène. Dans un premier temps, nous avons souhaité caractériser les sARN dont l'expression était altérée en cas de stress antiseptique exercé par de la chlorhexidine, du chlorure de benzalkonium, de la povidone iodée et du triclosan. Nous avons montré que ce stress entraînait une répression globale des sARN étudiés chez *E. faecium* mais pas chez *S. aureus*. Dans un second temps, l'étude approfondie d'un sARN d'*E. faecium* sélectionné, l'Ern0160, a permis de mettre en évidence la toute première cible directe d'un sARN de *E. faecium*. En effet, l'Ern0160 se lie spécifiquement à un ARN messager dont la protéine correspondante serait impliquée dans la virulence d'après un modèle expérimental murin. L'Ern0160 régule négativement l'expression de sa cible *in vitro*. L'impact de l'Ern0160 sur l'atténuation de la virulence de *E. faecium* reste à évaluer *in vivo* afin d'avoir une vision globale de son rôle dans la pathogénicité de ce dernier.

Titre : Regulatory RNA-mediated regulations for adaptation of *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* to biocide stress

Keywords : biocides, sRNA, subinhibitory concentration, resistance, virulence.

Abstract : *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* are opportunistic pathogens in human and responsible for hospital outbreaks. Antiseptics are widely used in the hospital to prevent these infections. Even at low concentrations, called subinhibitory concentrations, antiseptics likely provide a stress that bacteria must cope with. Regulatory RNAs (sRNAs) are key players in adaptive networks of bacteria to environmental changes. They have been well-studied in *S. aureus* by contrast with *E. faecium*, leading to uneven knowledges. We first aimed to characterize the sRNAs whose expression was altered under antiseptic stress of chlorhexidine, benzalkonium chloride, PVP iodine and triclosan. We showed that it led to a global repression of the studied sRNAs in *E. faecium* but not in *S. aureus*. Then, we focused on a selected sRNA of *E. faecium*, Ern0160 and highlighted the very first direct target of a sRNA of *E. faecium*. Indeed, Ern0160 specifically binds to a messenger RNA that encode a protein that has been previously described as involved in virulence in mouse model. Ern0160 downregulates the expression of its target *in vitro*. The impact of Ern0160 on the attenuation of virulence of *E. faecium* remains to be investigated *in vivo* to further characterize its role in *E. faecium* pathogenicity.